

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA**



**Validación de un método analítico para la cuantificación de Clorfenamina  
Maleato 4 mg tabletas por Cromatografía Líquida de Alta Performance  
(H.P.L.C.)**

**Tesis para optar el Título Profesional de:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO Y BIOQUÍMICO**

**BACHILLER:** CHUMIOQUE GARCIA, Giovani Joy

**ASESOR:** ECHEVARRIA RODRIGUEZ-SAWAO, Daniel

**Fecha de sustentación: 15 de Enero del 2015**

**LIMA- PERÚ  
2014**

**DEDICATORIA:**

A mis padres Jaime Chumioque Huapaya y Magali García Guevara por brindarme su apoyo incondicional, amor, ejemplo de lucha y por su esfuerzo para lograr mi formación profesional y personal; a mis hermanas Dajana Cristel, Kathy Jasmin y Magaly Liseth por sus oraciones y apoyo que me alientan y me inspiran, y me dan la confianza que restablece mi fe y seguridad.

**AGRADECIMIENTO:**

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega por la formación profesional recibida.

A los docentes de la facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega por transmitirme sus conocimientos y experiencias.

Al Laboratorio TEVA PERU S.A. por brindarme las facilidades para la realización del presente trabajo.

A todos mis amigos de trabajo que siempre me estuvieron dando su apoyo y que hicieron posible la culminación del presente trabajo.

A mi asesor Dr. Daniel Echevarría Rodríguez-Sawao por brindarme su amistad, su invaluable orientación, consejos, sugerencias y por ser el promotor de la realización de esta tesis.

A todas las personas que hicieron posible realizar el presente trabajo.

## ABREVIATURAS

a	Término independiente de la recta de regresión
b	Pendiente de la recta regresión o curva de calibración
f	Factor de respuesta
gl	Grados de libertad
K'	Factor de capacidad
n	Tamaño de la muestra
r	Coeficiente de correlación
$r^2$	Coeficiente de determinación
$s^2$	Varianza de una muestra
t	Test estadístico de Student
tr	Tiempo de retención de un analito
x	variable independiente (valor nominal)
y	Variable dependiente (valor experimental)
AOAC	Association of Official Analytical chemist
ASTM	American Society for Testing and Materials
BPC	Buenas Prácticas clínicas
CV (CV%)	Coeficiente de variación
D	Degradación
DS	Desviación estándar
DSR	Desviación estándar relativo
DQ	Calificación del diseño
FDA	Food and Drug Administration
G	Test estadístico de la prueba de homogeneidad de varianza de cochrane
GMP (BPM)	Buenas Prácticas de Manufactura
GLP (BPL)	Buenas Prácticas de Laboratorio
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Performance
IC	Intervalo de confianza
ICH	International conference of Harmonization

ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	International Union of Pure and Applied chemistry
IQ	Calificación de Instalación
K'	Numero de grupos
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
MQ	Calificación de mantenimiento
OQ	Calificación de operación
OMS	Organización Mundial de salud
P.A.	Para Análisis
PMV	Plan Maestro de Validaciones
PQ	Calificación de desempeño
R(R%)	Porcentaje de recuperación
Rs	Resolución (Cromatografía)
SOP	Procedimiento de Operación estándar
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta
VP	Validación de proceso
VT	Validación de técnica

## ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN – PALABRAS CLAVES

SUMMARY – KEY WORDS

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>III.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>4</b>
<b>IV.</b>	<b>GENERALIDADES.....</b>	<b>5</b>
4.1.	Sistema de calidad.....	5
4.2.	Calidad en la industria farmacéutica.....	6
4.2.1.	Calidad.....	6
4.2.2.	Administración de la calidad.....	6
4.2.3.	Garantía de la calidad.....	7
4.2.3.1.	Buenas Prácticas de Manufactura (GMP).....	8
4.2.3.2.	Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP).....	8
	a) Control de calidad.....	8
	b) Normas correctas del Laboratorio Analítico.....	9
4.3.	Validación.....	10
4.3.1.	Concepto.....	10
4.3.2.	Importancia.....	10
4.3.3.	Tipos de validación.....	11
	a) Validación prospectiva.....	11
	b) Validación retrospectiva.....	11
	c) Validación concurrente.....	11
	d) Revalidación.....	12
4.3.4.	¿Por qué validar?.....	12

4.3.5. ¿Qué validar?.....	12
4.3.6. Validación de métodos analíticos.....	13
a) Importancia.....	13
b) Inicio de una validación.....	13
c) Documentos de validación.....	14
d) Protocolo de validación.....	14
e) Certificado de validación.....	14
4.3.7. Desarrollo de un método analítico.....	15
4.3.8. Parámetros de validación de métodos analíticos.....	16
a. Precisión.....	16
b. Exactitud.....	18
c. Límite de Detección (LD).....	18
d. Límite de Cuantificación (LC).....	19
e. Especificidad.....	19
f. Selectividad.....	19
g. Sensibilidad.....	20
h. Linealidad y Rango.....	20
i. Robustez.....	21
j. Idoneidad del Sistema.....	21
4.3.9. Datos requeridos para la validación de un método analítico.....	21
4.4. Análisis instrumental.....	23
4.4.1. Cromatografía Líquida de Alta Performance.....	23
4.4.1.1. Conceptos generales.....	23
4.4.1.2. Calibración del equipo HPLC.....	24
a. Calificación de la instalación (IQ).....	24
b. Calificación de la operación (OQ).....	25
c. Calificación del desempeño (PQ).....	26
d. Calificación del mantenimiento y recalificación (MQ).....	26
4.4.1.3. Tipos de cromatografías líquidas.....	27

a.	Cromatografía de pares iónicos.....	27
b.	Cromatografía de fase reversa.....	28
4.4.1.4.	Características del equipo HPLC.....	29
4.4.1.5.	Partes del HPLC.....	30
a.	Bomba.....	30
b.	Inyectores.....	31
c.	Detectores.....	32
d.	Sistema de cromatografía líquida.....	34
-	Fase estacionaria y fase móvil.....	34
-	Columna.....	35
4.5.	Propiedades físicas, químicas y farmacológicas del analito.....	38
4.5.1.	Clorfenamina Maleato.....	38
<b>V.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>40</b>
5.1.	Equipos, materiales y reactivos.....	40
5.2.	Validación del método analítico.....	41
5.2.1.	Protocolo de validación.....	42
a.	Objetivo.....	42
b.	Alcance.....	42
c.	Consideraciones preliminares.....	42
d.	Responsabilidades.....	42
e.	Procedimiento.....	43
5.2.2.	Técnica analítica desarrollada.....	44
5.2.3.	Parámetros a validar.....	47
5.2.4.	Desarrollo de los parámetros de validación.....	48
5.2.4.1.	Especificidad.....	48
A)	Determinación de picos.....	48
B)	Determinación de productos de degradación.....	49
5.2.4.2.	Linealidad.....	50
a.	Linealidad de sistema.....	50



	b. Linealidad de método.....	51
5.2.4.3.	Exactitud.....	53
5.2.4.4.	Precisión (Repetibilidad / Precisión Intermedia).....	54
5.2.4.5.	Rango.....	56
5.2.4.6.	Robustez.....	56
5.2.4.7.	Estabilidad.....	56
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
6.1.	Especificidad.....	58
6.2.	Linealidad.....	59
6.3.	Exactitud.....	68
6.4.	Precisión.....	70
6.4.1.	Repetibilidad.....	70
6.4.2.	Precisión Intermedia.....	71
6.5.	Robustez.....	72
6.6.	Estabilidad.....	73
<b>VII.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>74</b>
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>IX.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>79</b>
<b>X.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>80</b>
<b>XI.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>83</b>

## RESUMEN

La validación de un método analítico constituye un instrumento importante para garantizar la calidad del medicamento, a fin de asegurar que cumpla los parámetros de calidad establecidos.

La validación es un proceso establecido que obtiene pruebas documentadas y demostrativas para que un método de análisis sea lo suficientemente fiable y reproducible dentro de los intervalos definidos. La validación de un método analítico es un requisito necesario para cumplir con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y asegurar la calidad del medicamento.

El análisis por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) de productos farmacéuticos es necesario y de uso rutinario. Esta técnica evita errores que conllevan a situaciones de riesgo al usuario, garantizando que la dosis prescrita llegue al paciente en la cantidad apropiada.

La Técnica Analítica desarrollada y propuesta en el presente trabajo plantea la cuantificación por el método de HPLC de Clorfenamina Maleato 4 mg Tabletas. En el cual se procedió a la validación del método de análisis evaluando los parámetros que indican las obras oficiales (Farmacopeas e ICH), como son: especificidad, linealidad, precisión, exactitud, rango, robustez y estabilidad.

Posteriormente, se elaboró el Protocolo de validación del método de análisis, se contó con el diseño experimental y los procedimientos estadísticos, concluyéndose que el método analítico propuesto es específico, lineal, preciso, exacto y estable; comprobándose su validez.

**Palabras claves:** Validación, Método analítico, Cromatografía Líquida de Alta Performance, Clorfenamina Maleato.

## SUMMARY

The validation of an analytic method constitutes an important instrument to guarantee the quality of the medication to ensure that it meets the quality standards established. Validation is an established process that gets documented and supporting evidence for a method of analysis is sufficiently reliable and reproducible within defined intervals. The validation of an analytical method is necessary to comply with Good Manufacturing Practices (GMP) and ensure drug quality requirement.

Analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) pharmaceuticals is necessary and routine use. This technique avoids mistakes that lead to risks to the user, ensuring that the prescribed dose reaches the patient in the proper amount.

The Analytical Technique developed and proposed in this paper focuses on the quantification by HPLC method Chlorpheniramine Maleate 4 mg Tablets. In which we proceeded to the validation of the analytical method to evaluate the parameters that indicate the official works (Pharmacopoeia and ICH), such as: specificity, linearity, precision, accuracy, range, robustness and stability.

Subsequently, the validation protocol analysis method was developed, he had the experimental design and statistical procedures, concluding that the proposed analytical method is specific, linear, accurate, precise and stable; checked for validity.

**Key words:** Validation, Analytical Method, High Performance Liquid Chromatography, Chlorpheniramine Maleate:

## I. INTRODUCCIÓN

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece por medio de un estudio y programa documentado que ese método posee todos los requisitos para el uso propuesto. La validación es parte integral de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y del desarrollo de un método de análisis; sin fiabilidad de los resultados analíticos es imposible asegurar que un medicamento cumple con las especificaciones exigidas, además, contribuye a garantizar la calidad y asegura las propiedades de calidad de un producto determinado.

El adquirir conocimientos de medicina contribuye a satisfacer una de las grandes demandas de la sociedad, proporcionar solución a problemas de salud, por lo cual una de las características más importantes de toda empresa es la calidad de sus productos, ya que de esto dependerá su prestigio, así como el desarrollo económico y crecimiento de la misma. Una de las herramientas con las que se cuenta para asegurar la calidad de sus productos y procedimientos es la validación de los métodos analíticos, por lo cual, la adopción de uno nuevo, debe estar sustentado por suficientes datos de laboratorio y una bien documentada información.

El constante crecimiento y expansión del mercado exige que las empresas se preparen y busquen la calidad en sus productos y procesos, para utilizarlo como una ventaja competitiva. Lo anterior, aumenta la necesidad de obtener certificaciones que garanticen la calidad del producto, como por ejemplo la certificación ISO 9001-2008, y dentro de sus requisitos se encuentra que los productos deben tener metodologías de análisis validadas.

Por otra parte, los métodos analíticos deben validarse para cumplir con las exigencias contempladas en la Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID), en el artículo 176º del Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de productos farmacéuticos, así como también en la Farmacopea Estadounidense (USP).

La calidad de los resultados analíticos debe estar amparada mediante la fiabilidad y reproducibilidad del método analítico utilizado en su obtención y esta demostración

debe estar debidamente documentada con el detalle de la preparación de las muestras efectuadas y datos obtenidos.

Hoy en día, la validación es un tema que muestra un interés creciente en la industria farmacéutica debido al mayor énfasis que ha puesto la industria en años recientes en los temas de aseguramiento de la calidad y mejora de la productividad. La validación, por tanto, forma parte importante de un programa de aseguramiento de la calidad y es fundamental para una eficiente operación de producción.

En el presente trabajo de tesis se realizó el desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación por HPLC de Clorfenamina Maleato 4 mg Tabletas, debido a no encontrarse un método para este producto en obras oficiales. El desarrollo del trabajo se realizó en Laboratorios TEVA PERU S.A.

## **II. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **GENERAL:**

Demostrar que el nuevo método analítico para la cuantificación de Clorfenamina Maleato 4 mg tabletas por Cromatografía Líquida de Alta Performance (H.P.L.C.) cumple con las exigencias en todos los parámetros de la validación.

### **ESPECÍFICOS:**

- Desarrollar un esquema para la validación, con exigencias de linealidad, exactitud, precisión, especificidad, rango, robustez y estabilidad.
- Determinar la validez del método analítico y verificar los parámetros de aceptabilidad para validar la técnica en función a los criterios de la USP, estableciendo un protocolo de validación por Cromatografía Líquida de Alta Performance.

### **III. HIPÓTESIS**

#### **GENERAL:**

El nuevo método analítico para la cuantificación de Clorfenamina Maleato 4 mg tabletas por Cromatografía Líquida de Alta Performance (H.P.L.C.) cumple con todas las exigencias en todos los parámetros de la validación.

#### **SUBHIPÓTESIS:**

- El desarrollo de un esquema para la validación proporciona las exigencias de linealidad, exactitud, precisión, especificidad, rango, robustez y estabilidad.
- Es válido el método analítico y se verifica los parámetros de aceptabilidad para validar la técnica en función a los criterios de la USP, estableciendo un protocolo de validación por Cromatografía Líquida de Alta Performance.

## **IV. GENERALIDADES**

### **4.1. SISTEMA DE CALIDAD**

El sistema de calidad es un método planificado y sistemático de medios y acciones, encaminado a asegurar suficiente confianza en que los productos o servicios, se ajusten a las especificaciones.

Un laboratorio de análisis químico o clínico debe tener como uno de sus propósitos principales la producción de datos analíticos de alta calidad por medio del uso de mediciones analíticas que sean precisas, confiables y adecuadas para tal fin. Este propósito puede alcanzarse de una manera eficaz si se cuenta con un sistema planificado y documentado de la calidad de las actividades.

Para alcanzar este nivel de distinción (que el laboratorio lo necesita para poder acreditarse y así obtener contratos de análisis) el laboratorio necesitara operar bajo un sistema de garantía de calidad que incluya una extensa documentación de sus actividades. <sup>(1)</sup>

#### **Gestión de la calidad:**

Es un sistema de medios para generar económicamente productos y servicios que satisfagan los requerimientos del cliente. La implementación de este sistema necesita de la cooperación de todo el personal de la organización, desde el nivel gerencial hasta el operativo e involucrando a todas las áreas.

Los 14 puntos de Deming:

- Crear constancia en el propósito para la mejora de productos y servicios.
- Adoptar una nueva filosofía.
- Dejar de confiar en la inspección masiva.
- Poner fin a la práctica de conceder negocios con base en el precio únicamente.
- Mejorar constantemente y por siempre el sistema de producción y servicios.
- Instituir la capacitación.



- Instituir el liderazgo.
- Eliminar el temor.
- Derribar las barreras que hay entre las áreas.
- Eliminar lemas, las exhortaciones y las metas de producción para la fuerza laboral.
- Eliminar las cuotas numéricas.
- Remover las barreras que impiden el orgullo por un trabajo bien hecho.
- Instituir un programa vigoroso de educación y capacitación.
- Tomar medidas para llevar a cabo la transformación.

## **4.2. CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA**

### **4.2.1 CALIDAD**

Según la International Organization for Standardization (ISO): Es el conjunto de propiedades y características de un producto, proceso o servicio que le confiere la aptitud de satisfacer las necesidades y las expectativas del cliente. (ISO 9001-2008).

### **4.2.2 ADMINISTRACIÓN DE LA CALIDAD**

Se define como el aspecto de la función administrativa que determina y pone en práctica la Política de la Calidad es decir la orientación y las intenciones generales de un organismo en lo que respecta a calidad, en la forma como lo expresan y lo autorizan las autoridades superiores de dicho organismo.

Sus elementos básicos son los siguientes:

- a) Sistema de Calidad que comprende la estructura, procedimientos, procesos y recursos.
- b) Garantía de la Calidad, concepto que involucra las medidas que se adoptan para asegurar que el producto satisface determinadas condiciones de calidad.

Los conceptos de Garantía de la Calidad, Buenas Prácticas de Manufactura (GMP), Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) y Control de Calidad,

constituyen aspectos de la administración de la calidad y se relacionan entre sí. <sup>(5)</sup>

#### **4.2.3 GARANTÍA DE LA CALIDAD**

Es el conjunto de medidas que se adoptan con el fin de asegurar que los productos farmacéuticos sean de la calidad requerida para el uso al que están destinados. Por lo tanto, Garantía de la Calidad incorpora las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) y otros conceptos; incluyendo aquellos que van más allá del alcance de estos lineamientos, tales como el diseño y el desarrollo del producto. <sup>(5)</sup>

El sistema de garantía de Calidad adecuado para la fabricación de medicamentos debe asegurar que:

- a) Los productos estén diseñados y elaborados de tal manera que se tenga en cuenta los requisitos de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y la Buena Práctica Clínica (BPC), incluyendo el diseño y el desarrollo del producto.
- b) Las operaciones de producción y control estén claramente especificadas por escrito, y que se adapten a los requisitos de las BPM.
- c) Las responsabilidades administrativas estén claramente especificadas en las descripciones de trabajo.
- d) Se tomen las medidas necesarias para la fabricación, suministro y uso de materias primas y materiales de empaque adecuados.
- e) Se efectúen todos los controles necesarios de las materias primas, productos intermedios, productos a granel con las calibraciones y controles durante el proceso.
- f) El producto terminado sea procesado y controlado correctamente y de acuerdo con los procedimientos definidos.
- g) Los productos farmacéuticos no sean vendidos ni suministrados antes de que las personas autorizadas certifiquen que cada lote de producción ha sido fabricado y controlado en concordancia con los requisitos establecidos en su Registro Sanitario y conforme a las BPM.

- h) Se tomen medidas adecuadas para asegurar, que los productos Farmacéuticos sean almacenados, distribuidos y manejados de tal forma que la calidad se mantenga durante todo su periodo de validez.
- i) Se establezca un procedimiento de auto inspección y/o de auditoría de calidad, que permita evaluar regularmente la eficacia y aplicabilidad del sistema de garantía de la calidad.<sup>(2)</sup>

#### **4.2.3.1 BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA (GMP)**

Son el conjunto de normas que tanto la industria farmacéutica como la cosmética ponen en práctica con el fin de asegurar la calidad de los productos que fabrican. Establecen que todas las operaciones, procesos, métodos o técnicas sean estrictas o reguladas, cumplidas y supervisadas por profesionales con la suficiente responsabilidad.

#### **4.2.3.2 BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO (GLP)**

Son normas y procedimientos de operaciones oficiales considerados como requerimientos mínimos para promover la calidad e integridad de un producto, nacen de la necesidad de contar con datos analíticos de confianza y un seguimiento de todo el proceso, para poder juzgar sobre la seguridad de un producto.<sup>(7)</sup>

Las GLP pretenden asegurar la calidad y validez de los datos de los análisis. Además, facilita el comportamiento adecuado del estudio, promueve el exacto y completo reporte de los medios por los cuales se puede verificar la integridad de los mismos.<sup>(7)</sup>

##### **a) Control de Calidad**

Son actividades planeadas y diseñadas para proporcionar un producto de calidad.

Control de calidad forma parte de las buenas prácticas de manufactura, en el cual se encuentran involucrados: las especificaciones, el muestreo y los análisis, así como también los procedimientos de organización,

documentación y autorización que aseguren que se lleven a cabo todas las pruebas pertinentes, autorizando el uso de materiales y la expedición de productos para venta, solo si se ha establecido que la calidad de dicho producto es satisfactorio.

El control de calidad no se limita a las operaciones de laboratorio, sino que debe estar involucrado en todas las decisiones vinculadas con la calidad del producto. Se considera fundamental que control de calidad sea independiente del área de producción. <sup>(4)(5)</sup>

### **b) Normas Correctas del Laboratorio Analítico**

Para validar un método analítico, se requiere en primer lugar, un entorno de trabajo que garantice la seguridad de los resultados que se obtengan.

La garantía de la calidad de los resultados obtenidos en un laboratorio analítico requiere actuar mediante procedimientos correctos, previamente establecidos, que se definen como normas correctas del laboratorio analítico.

Esta norma incluye, entre otros, los siguientes aspectos:

- Buena organización funcional.
- Personal en cantidad adecuada y capacitada.
- Instalaciones adecuadas y en cantidad necesaria.
- Métodos descritos, disponibles, actualizados y aprobados.
- Equipos y aparatos apropiados, calificados y en buen estado de funcionamiento.
- Procedimientos apropiados para la toma de muestra.
- Utilización de reactivos apropiados y soluciones valoradas adecuadas.
- Utilización del material auxiliar (vidrio, etc.) apropiado y en perfectas condiciones para su uso.
- Utilización de patrones y muestras de referencias correctas.
- Verificación – supervisión de los resultados obtenidos y que los registros de los análisis efectuados sean auditables.
- Adecuada información y comunicación de los resultados obtenidos.

- Higiene y seguridad.
- Autoinspección. <sup>(6)(7)</sup>

### **4.3. VALIDACIÓN**

#### **4.3.1 CONCEPTO**

Se define como el establecimiento de pruebas documentadas que aportan un alto grado de seguridad de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificados. Los estudios de validación son aplicables a las pruebas analíticas, los equipos, los sistemas y servicios de establecimientos (como aire, agua, vapor) y procesos (como el de fabricación, limpieza, esterilización, llenado estéril, liofilización, etc.). <sup>(2)</sup>

“La validación de métodos, es el proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado.” FDA draft guidance. <sup>(25)</sup>

“El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado.” ICH guideline Q2A. <sup>(26)</sup>

“El acto documentado de probar que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad, o sistema conduce realmente a los resultados esperados.” OMS <sup>(27)</sup>

#### **4.3.2 IMPORTANCIA**

- Asegura que el producto elaborado cumple en forma consistente y repetitiva con sus especificaciones y atributos de calidad.
- Ayuda a cumplir los objetivos de productividad establecidos.
- Permite disminuir los costos de proceso. <sup>(2)</sup>

### 4.3.3 TIPOS DE VALIDACIÓN

#### **a) Validación Prospectiva**

Es la que se realiza sobre un proceso antes de que sea implementado, el cual puede darse para la fabricación de nuevos productos, cuando hay cambios fundamentales en un proceso o cuando se incorpora un equipo o sistema para uso.

Es la validación que comúnmente se elige porque nos asegura el éxito del proceso antes de su implementación, además que se pueden elegir y controlar las variables a ensayar en el proceso. <sup>(10)</sup>

#### **b) Validación Retrospectiva**

Es la que se realiza sobre el análisis de ensayos ya elaborados, en la cual se revisa y analiza con métodos estadísticos los parámetros físicos y los resultados analíticos de por lo menos 10 a 30 consecutivos, no debiendo existir cambios en la formulación, modificaciones sustanciales de equipo o instalaciones, ni cambios en el método de ensayo. El proceso se considera válido si al menos el 95% de los resultados analíticos cumplen con las especificaciones internas y al menos el 90% de los controles de proceso no tienen variaciones significativas. <sup>(10)</sup>

#### **c) Validación Concurrente**

Es la que se produce cuando es imposible completar la validación antes de la puesta en el mercado del producto farmacéutico. Se da si sólo se ha producido un limitado número de lotes o si los lotes no se producen frecuentemente o tal vez si la fabricación se ha producido con modificaciones y las pruebas demuestran que los parámetros estén conformes. En este caso, se incrementan las pruebas del número de análisis. <sup>(10)</sup>

#### **d) Revalidación**

Se realiza cuando un método validado ha sido modificado en alguno de los pasos del procedimiento establecido, o se ha variado alguno de los instrumentos, reactivo o material empleado originalmente, y se realiza en periodos establecidos. <sup>(2)</sup> <sup>(10)</sup>

#### **4.3.4 ¿PORQUÉ VALIDAR? <sup>(10)</sup>**

Nos interesa mantener un método que sea estable, capaz y robusto. Un método validado nos da la seguridad de ello, dado que estas características son esenciales para mantener altos niveles de calidad en los resultados del análisis.

Entonces, ¿Por qué validar?:

- Validando aseguramos que se cumpla con los requerimientos preestablecidos, confirmando su precisión y exactitud.
- También validando aseguramos que las modificaciones de las condiciones normales de ensayo y medio ambiente operacional no afecten negativamente el resultado final.
- Porque validando tenemos un control de los puntos críticos del ensayo y así prevenir y evitar resultados erróneos que afecten la calidad de análisis.

#### **4.3.5 ¿QUÉ VALIDAR? <sup>(10)</sup>**

En un análisis de laboratorio debe considerarse validar todo equipo o procedimiento que influya en la calidad final del resultado, así tenemos:

- Los equipos, incluido el control por computadora.
- Los métodos de análisis (se considera aquella que no están comprendidos en obras oficiales como: AOAC, USP, BP, FN, etc.).
- El sistema analítico en su conjunto.
- Todo cambio o modificaciones importantes que se efectúen en el método, equipo o técnica de análisis del producto.

#### **4.3.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

Es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. <sup>(6) (7)</sup>

El laboratorio deberá validar:

- Métodos no estandarizados.
- Métodos no diseñados o desarrollados internamente.
- Métodos estandarizados usados fuera del alcance propuesto.
- Ampliaciones o modificaciones de métodos estandarizados.
- Cuando se realizan algunos cambios en los métodos no estandarizados ya validados, se debe documentar la influencia de tales cambios y, si es necesario, se debe efectuar una nueva validación. <sup>(6) (7)</sup>

##### **a) IMPORTANCIA**

- Se demuestra que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas, ya que la validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.
- Se trabaja con métodos que ofrecen confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimiza el número de fallas y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costos.
- Trabajar con métodos validados permite no sólo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales (GMP), con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto. <sup>(6) (7)</sup>

##### **b) INICIO DE UNA VALIDACIÓN**

La validación empieza en la planificación, formalizada usualmente a través de un plan maestro de validación (PMV).



- Esta planificación incluye proveer la realización de todas las instancias de calibración, mantenimiento, capacitación, desarrollo de documentos, etc., que corresponda, antes de comenzar con las actividades de validación propiamente dichas. <sup>(10)</sup>

### **c) DOCUMENTOS DE LA VALIDACIÓN**

La documentación es una parte esencial de la validación ya que interviene en todo el proceso. Las fases que consta una validación son:

- Protocolo de la validación
- Realización de la validación
- Evaluación de los resultados analíticos
- Informe de validación
- Certificado de validación

### **d) PROTOCOLO DE VALIDACIÓN**

Un protocolo es un conjunto de registros que permiten documentar el proceso de validación, en el se describen los detalles de un estudio integral planificado para investigar el funcionamiento uniforme de un nuevo sistema/equipo, un nuevo procedimiento o la aceptabilidad de un nuevo proceso antes de ejecutarlo. Los protocolos incluyen antecedentes importantes, explican el fundamento lógico y el objetivo del estudio, ofrecen una descripción completa de los procedimientos que habrán de seguirse, fija los parámetros que habrán de medirse, describen como se analizan los resultados y facilita los criterios de aceptación determinados con anterioridad para extraer las conclusiones. Los estudios de validación, los estudios de estabilidad y los estudios clínicos son ejemplos de protocolos escritos para la industria farmacéutica.

Los protocolos de validación son importantes para asegurar que se recaben pruebas documentadas a fin de demostrar que un equipo, un

sistema, un proceso o un método analítico se desempeñan uniformemente en conformidad con el nivel especificado.<sup>(2)</sup>

#### **e) CERTIFICADO DE VALIDACIÓN**

El certificado de validación o documento formal de aprobación que emite el laboratorio con los resultados obtenidos para cada parámetro, debe ser firmado por las personas responsables. Este certificado puede ser independiente, incluyendo un resumen del protocolo de validación y de los resultados obtenidos, o bien anexarse al final del informe.

Los documentos referentes a la validación se archivarán adecuadamente durante todo el tiempo de vida del producto.<sup>(6) (7) (12)</sup>

### **4.3.7 DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO**

No existe una guía oficial que indique la secuencia de experimentos analíticos necesarios para el desarrollo de un método, ya que esto depende del método en sí mismo. No obstante el desarrollo lógico de un método analítico transcurre en diferentes fases.

#### **a) Características de Practicabilidad**

Han de evaluarse los parámetros de practicabilidad del método analítico: precisión exigible, sensibilidad deseable, grado de especificidad, tiempo, costo, tamaño de la muestra, calificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, etc.

#### **b) Características de Idoneidad**

La puesta a punto del método analítico incluye desde los primeros estudios de tanteo con patrones, hasta la utilización del método en muestras reales que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el momento del análisis.

#### **c) Características de Fiabilidad**

Esta última etapa permitirá conocer las características de fiabilidad del método para su aplicación rutinaria. Dichas características son las que

demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación. <sup>(6) (7)</sup>

#### **4.3.8 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

Las características de desempeño de un método analítico se expresan en función de los parámetros analíticos. Estos parámetros analíticos considerados en validación son:

- a. Precisión
- b. Exactitud
- c. Límite de Detección
- d. Límite de Cuantificación
- e. Selectividad
- f. Sensibilidad
- g. Especificidad \*
- h. Linealidad y rango
- i. Robustez
- j. Idoneidad del sistema

\* Algunas autoridades hacen la distinción entre especificidad y selectividad.

Ambos términos se refieren a la habilidad del método de proveer un cálculo de analito en presencia de otros componentes de una muestra. La diferencia está en que la selectividad del método provee exactitud de resultados para todos los analitos de interés, mientras que la especificidad está referida a la exactitud de resultados para un analito y otros de interés pueden interferir uno con otros. A continuación definiremos los diferentes parámetros analíticos de validación junto con una breve explicación de cómo puede medirse.

##### **a. Precisión**

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.

La procedencia de las muestras destinadas al estudio de la precisión puede ser de muestras reales o preparadas en el laboratorio.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más – menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. <sup>(6) (7)</sup>

La precisión engloba diferentes tipos de estudio:

### **Repetibilidad**

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

La repetibilidad se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) de una serie de medidas.

Uno de los factores que más puede influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito. <sup>(6) (7)</sup>

### **Precisión Intermedia**

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en diferentes condiciones operativas (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio.

En el estudio de la precisión intermedia se deben considerar aquellas circunstancias en las que se pretende desarrollar el método de ensayo. El analista debe evaluar los efectos causados al variar una serie de factores. Típicos factores a estudiar incluyen el día, el analista, el instrumento, etc. <sup>(6) (7)</sup>

## **Reproducibilidad**

Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios. La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas. La reproducibilidad de dicho método de análisis se determina analizando una serie de alícuotas procedentes de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, diferentes analistas y utilizando condiciones operativas y ambientales distintas pero siguiendo el procedimiento descrito en el método. <sup>(6)</sup>  
<sup>(7)</sup>

### **b. Exactitud**

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado. No deben confundirse exactitud y precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que esta del valor verdadero.

Se puede tener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión. <sup>(6)</sup> <sup>(7)</sup>

### **c. Límite de Detección (LD)**

Se entiende por límite de detección la mínima cantidad del analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales. El límite de detección es por tanto un término sólo cualitativo. En ambos términos se encuentra un rango de concentraciones en las que si bien no puede cuantificarse el analito en cuestión con razonable certeza, si puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos. <sup>(6)</sup> <sup>(7)</sup>

#### **d. Límite de Cuantificación (LC)**

Se entiende por límite de cuantificación de dicho método, la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud. El límite de cuantificación es por lo tanto un término cuantitativo. <sup>(6) (7)</sup>

#### **e. Especificidad**

Capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios.

En análisis cualitativos (pruebas de identificación), debe demostrarse la capacidad de distinguir compuestos de estructura estrechamente relacionada cuya presencia resulta probable. Esta capacidad debería confirmarse mediante la obtención de resultados positivos a partir de muestras que contengan el analito (quizás mediante comparación con un material de referencia conocido), junto con resultados negativos de muestras que no contengan dicho analito, y mediante la confirmación de que no se obtiene una respuesta positiva de materiales con estructura similar o estrechamente relacionada a la del analito. <sup>(11)</sup>

#### **f. Selectividad**

Capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de formas inequívocas, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra.

La selectividad de un método analítico se determina antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencias de otras sustancias relacionadas con el de una u otra forma. <sup>(6)</sup>

<sup>(7)</sup>

### **g. Sensibilidad**

Se define como la capacidad de un método analítico para detectar pequeñas variaciones en las concentraciones de analito en la muestra.

Se calcula inyectando concentraciones menores a las del rango de trabajo y en esas concentraciones se determina la ecuación de la recta:

$$Y = bx + a$$

Donde:

x: La concentración del analito

y: Valor de la respuesta en área del pico cromatográfico

b: Valor de la pendiente de la recta

a: Valor del intercepto de la recta con el eje y

Extrapolando a una concentración  $dx = 0$  se obtiene el valor de Y (blanco), con los datos de la desviación estándar para cada concentración de la curva de calibración a bajas concentraciones se calcula la ecuación que represente a la recta: Concentración vs Desviación estándar. De la ecuación de la recta extrapolando la desviación a concentración cero, tenemos el  $S_{bl}$ , cuyo valor se empleara en la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación. <sup>(10)</sup>

### **h. Linealidad y Rango**

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

Siempre que sea posible se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación.

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito. <sup>(6) (7)</sup>

#### **i. Robustez**

La robustez de un método analítico es la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad “estabilidad” durante su empleo en rutina.

Es por tanto la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptible de producirse durante su utilización. <sup>(6) (7)</sup>

#### **j. Idoneidad del Sistema**

El test de idoneidad del sistema (system suitability test) consiste en un conjunto de ensayos que permitan comprobar en el momento de la utilización del método, que el sistema (analista, reactivos e instrumentos) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. Por lo tanto, el test de idoneidad del sistema se ha de entender como parte integrante del procedimiento de análisis y requisito previo a su realización. <sup>(6) (7)</sup>

### **4.3.9 DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO**

Los métodos analíticos descritos varían desde determinaciones analíticas complejas hasta la evaluación subjetiva de ciertas características, para los cuales se requieren diferentes esquemas de validación. Las categorías de métodos analíticos más comunes son las siguientes:

**Categoría I.** Incluye los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios de las materias primas o de los principios activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos.



**Categoría II.** Incluye los métodos analíticos empleados para la determinación de impurezas en materias primas o productos de degradación en los productos farmacéuticos. Estos métodos incluyen valoraciones cuantitativas y ensayos de límites.

**Categoría III.** Incluye métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (Ej., disolución, liberación de principios activos) de un producto farmacéutico.

**Categoría IV.** Ensayo de identificación de producto farmacéutico.

Para cada categoría de análisis, se necesita diferente información analítica.

En la tabla N° 1 se indica los elementos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías. <sup>(11)</sup>

**TABLA N° 1: REQUISITOS PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS SEGÚN SU CATEGORÍA.**

Características de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativos	Pruebas de Limite		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Limite de detección	No	No	Si	*	No
Limite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

\*Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

## **4.4. ANÁLISIS INSTRUMENTAL**

### **4.4.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE**

#### **4.4.1.1 CONCEPTOS GENERALES**

Las formulaciones farmacéuticas son mezclas complejas que incluyen, además de uno o más componentes medicinalmente activos, una serie de excipientes tales como diluyentes, desintegrantes, colorantes y saborizantes.

La Cromatografía Líquida de Alta Performance es una técnica de separación constituida por una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por partición, adsorción o procesos de intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. Los compuestos a analizar se disuelven en un líquido orgánico y la mayoría de las separaciones tienen lugar a temperatura ambiente. Por lo tanto, la mayoría de las drogas, sean compuestos no volátiles o térmicamente inestables, pueden analizarse mediante esta técnica sin riesgo de descomposición. El tiempo de elusión de un compuesto puede ser descrito por su factor de capacidad, ya que depende de la naturaleza química del compuesto analizado, la composición y la velocidad de flujo de la fase móvil y la composición y el área superficial de la fase estacionaria. La longitud de la columna es un parámetro determinante de la resolución. Sólo los compuestos que tienen diferentes factores de capacidad pueden ser separados por HPLC. <sup>(11)</sup>

En el caso más simple un cromatógrafo líquido estará constituido por:

- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Un sistema que permite la introducción de la muestra: el inyector.
- Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: la bomba.

- Un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna: el detector.
  - Un sistema de registro de los datos provenientes del detector.
- La señal del detector es siempre analógica y puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico o por un integrador, o digitalizada, para que pueda ser interpretada y procesada por una computadora.

#### **4.4.1.2 CALIBRACIÓN DEL EQUIPO HPLC**

Actividad destinada a demostrar que un instrumento de medida produce resultados dentro de los límites de error establecido y comparable a los obtenidos con un sistema de referencia en un rango apropiado de medidas.

La calibración forma parte de la calificación, se aplica a comprobar y documentar el funcionamiento del instrumento tanto en el ámbito modular como del sistema completo.

La calificación del instrumento HPLC consta de las siguientes etapas:

- Calificación de instalación.
- Calificación de operación.
- Calificación de desempeño.
- Calificación de mantenimiento. <sup>(15)</sup>

##### **a. Calificación de la Instalación (IQ)**

Una vez aprobado el diseño en la calificación del diseño (DQ), se procede a la instalación del sistema. El objetivo de la calificación de la instalación (IQ) es el de verificar las características del equipo y de su instalación, en referencia a las especificaciones técnicas, mediante la realización de una inspección física del diseño.

Debe contener la documentación completa de la instalación con las características técnicas detalladas del equipo y componentes,

materiales de construcción, lista de recambios, certificados de materiales y certificados de calibración de los instrumentos del campo.

Se aplica tanto a configuraciones modulares (módulo a módulo) como a sistemas integrados (todo el sistema).

Una vez realizadas las etapas anteriores se redactará el informe de calificación de la instalación (IQ). Si se detectase algún punto posible de mejora (crítico o no crítico) deberá constar en el informe y en el caso de detectarse algún punto crítico, éste deberá solventarse antes de pasar a la siguiente fase.

#### **b. Calificación de la Operación (OQ)**

El objetivo de esta fase es la verificación del equipo y componentes funcionen adecuadamente (operacionabilidad).

En el protocolo de la calificación operacional se describirán los ensayos a realizar para comprobar la operacionabilidad de los componentes del equipo, por una parte en funcionamiento normal y, por otra, en funcionamiento anómalo (comprobación de alarmas). Asimismo, y para cada ensayo se definirán los límites de aceptación.

También deberá comprobarse la existencia e idoneidad de los programas indispensables para el correcto funcionamiento del sistema (si no existiesen deberán redactarse): programas de mantenimiento, control de cambios, control de la documentación, calibración, formación del personal y asegurar que cada uno de los módulos que componen el sistema cromatográfico cumplan las especificaciones de exactitud, precisión, linealidad establecidas.

De esta manera, durante la fase de validación prospectiva de detalle, debe recopilarse una serie de documentación básica indispensable para el correcto funcionamiento del sistema y para iniciar la siguiente fase: La validación del equipo (PQ).

Finalmente, se escribirá la información de la calificación operacional, donde se resumirán los resultados de los ensayos de operacionabilidad

y se confirmará la existencia de todos y cada uno de los programas y procedimientos indispensables para el correcto funcionamiento del equipo.

Al igual que en el resto de informes de fases anteriores, si se detectase algún punto posible de mejora (crítico o no crítico) deberá constar en el informe y en el caso de detectarse algún punto crítico, éste deberá solventarse antes de pasar a la validación del equipo (PQ).

### **c. Calificación del Desempeño (PQ)**

De acuerdo con la Food & Drug Administration (FDA), una vez que los componentes del sistema han sido operacionalmente verificados en función de las especificaciones del proveedor y han sido comprobados, puede iniciarse la validación del sistema (PQ).

El objetivo de esta fase es el de verificar la consistencia y fiabilidad del sistema y piezas de equipo, se demostrará que cada parte realiza la función para la que está destinada, resultando en componentes, materiales, productos y resultados conformes a las especificaciones de calidad.

Deben comprobarse la existencia (o bien deben redactarse) los procedimientos operacionales estándar (SOP's) necesarios para el funcionamiento del sistema.

Estos procedimientos son de funcionamiento y puesta en marcha del sistema, mantenimiento, métodos analíticos, etc.

Para el ensayo de la calificación de funcionamiento del sistema se emplea una mezcla test, una columna y fase móvil bien caracterizada para evitar interferencias producidas por la química involucrada con cada uno de estos componentes.

### **d. Calificación del Mantenimiento y Recalificación (MQ)**

Una vez validado el sistema se ha asegurado la confiabilidad o capacidad del sistema.

Pero esta confiabilidad está condicionada al riguroso cumplimiento de todos los programas y procedimientos de operación estándar (SOP's) implantados durante el desarrollo de la validación.

Por ello, es necesario continuar con la siguiente fase (MQ), la cual es indispensable para asegurar la consistencia en el futuro de la calidad de los resultados obtenidos, mediante la implantación de un procedimiento de control de proceso del sistema. Este procedimiento debe comprender:

- Plan de control rutinario del sistema.
- Seguimiento y control de los diferentes programas y procedimientos establecidos durante las fases anteriores de la validación.
- Control de incidencias (con relación a averías así como a desviaciones de calidad de los resultados analíticos)
- Control de cambios de la instalación (regulando cuales han de ser validados).

#### **4.4.1.3 TIPOS DE CROMATOGRAFIAS LIQUIDAS**

##### **a. Cromatografía de pares iónicos**

La cromatografía de par-iónico es particularmente útil para la separación de solutos orgánicos cargados, tales como los ácidos y bases orgánicas. Estos compuestos pueden dar retención insuficiente, separación incompleta y/o picos con cola en condiciones de fase reversa.

Este tipo de cromatografía consiste en adicionar al eluyente cromatográfico un elemento iónico de forma que este interactúe con los analitos iónicos neutralizándolos para ser factible su separación en columnas de fase reversa. La formación de pares iónicos posee tres mecanismos probables: El primero tiene como finalidad añadir un segundo ión al eluyente que se combine con los iones de la muestra, enlazándose fuertemente a ellos por formación de un par iónico neutro que ya sufrirá los procesos normales de distribución por reparto, adsorción, etc, entre las fases estacionaria y móvil. El segundo mecanismo

probable puede ser la modificación de los iones de la muestra de modo que los pares iónicos así formados participen en el proceso de intercambio iónico. Finalmente, la utilización de pares iónicos para modificar la fase estacionaria adsorbiéndose el contra ión sobre el relleno de la columna, y luego los iones de la muestra de signo contrario se unirán al nuevo contra ión superficial. Se necesita un exceso de contra iones en la fase móvil para mantener una concentración constante de contra iones en la superficie de la parte estacionaria y para que contribuyan al proceso de distribución. Un reactivo de par iónico tal como el ión octil sulfonato o el tetrabutylamonio es adicionado a la fase móvil en una concentración molar, pero aparte de esto, no afecta la retención. <sup>(18)</sup>

#### **b. Cromatografía en fase reversa**

Las fases estacionarias de fase reversa en cromatografía líquida consisten en un ligando no polar unido en la superficie de partículas de sílica microporosa, se estima que el 70% o más de las separaciones analíticas en cromatografía líquida son llevadas a cabo en el modo de cromatografía de fase reversa. Las fases reversas más comunes son: octadecil, octil, feniletil y cianopropil. Debido al amplio campo de las aplicaciones, fácil uso, y la naturaleza de las fases octadecil y octil, uno de estos es usualmente la primera elección para probar una nueva separación. Las fases móviles en la cromatografía de fase reversa están constituidas por mezclas de solventes polares generalmente agua y un modificador orgánico (Metanol, acetonitrilo, THF), con o sin el agregado de aditivos (sales orgánicas o reactivos de apareamiento iónico), el dioxano y el THF se mezclan tanto con el agua como con solventes no polares (Cloroformo, hexano) y pueden considerarse tanto solventes de fase normal o como de fase reversa.

El acetonitrilo tiene por sus propiedades químicas una selectividad muy diferente a la del metanol que es modificador orgánico más utilizado en fase reversa, en mezclas con agua o buffer y por su mayor poder disolvente de sales y reactivos de apareamiento iónico se prefiere frente al acetonitrilo. La

retención en la separación por fase reversa está basada en la polaridad del soluto. Las moléculas más polares eluyen primero y las menos polares eluyen después, esto es debido a que las moléculas polares interaccionan con más fuerza con la fase móvil polar. El principal mecanismo de la retención es hidrofóbico o solvofóbico, esto significa que la repulsión de moléculas de la muestra del agua que contiene la fase móvil, controla la retención, no así la atracción entre el soluto y la fase estacionaria. Las fases móviles no polares dan tiempos de retención cortos y son llamados fases móviles fuertes, contrariamente, las fases móviles polares guían las moléculas, el soluto hacia la fase estacionaria, dando tiempos de retención más largos, estas son llamadas fases móviles débiles. El principal efecto del solvente en la cromatografía por fase reversa es que la polaridad de la fase móvil controla la retención. El mecanismo secundario de la retención en la cromatografía por fase reversa, es la interacción del soluto con los grupos silanoles en la fase estacionaria. Debido a que más del 50% de los grupos silanoles en la partícula de sílica permanecen sin reacción después de la primera reacción de enlace y encubrimiento, esta interacción juega un rol importante en la retención. La interacción del silanol es también responsable de los picos con cola cuando los compuestos polares son resueltos cromatográficamente, entonces son comúnmente añadidos a la fase móvil supresores de colas, tal como la trietilamina. Los ajustes de pH pueden también cambiar la retención debido a que los solutos ionizados interaccionan con más fuerza con la fase móvil que aquellos no ionizados y generalmente eluyen con mayor rapidez.<sup>(18)</sup>

#### **4.4.1.4 CARÁCTERÍSTICAS DEL EQUIPO HPLC**

Un cromatógrafo líquido consta de un reservorio que contiene la fase móvil, una bomba para formar la fase móvil a través del sistema de presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos como una computadora, integrador, o un registrador. Los sistemas de bombeo de HPLC bombean cantidades exactas de fase móvil desde los reservorios de solventes



a la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para soportar altas presiones. Las bombas empleadas para el análisis cuantitativo deben construirse con materiales inertes a los componentes corrosivos de la fase móvil y ser capaces de entregar la fase móvil en una velocidad constante, con fluctuaciones mínimas, durante periodos prolongados de tiempo. Después de ser disueltos en la fase móvil u otra solución apropiada, los compuestos a cromatografiar se inyectan en la fase móvil, mediante muestreadores automáticos. Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación se logra por la partición de los compuestos en la solución de prueba entre la fase móvil y la estacionaria. La cromatografía en sistemas que constan de fases estacionarias polares y fase móviles no polares se denomina “Cromatografía de fase normal”, por el contrario, cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina “Cromatografía de fase reversa”.

(19)

#### 4.4.1.5 PARTES DEL HPLC

##### a. Bomba <sup>(20)</sup>

Los sistemas de bombeo de HPLC administran cantidades exactas de fase móvil desde los recipientes hasta la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para altas presiones.

Existen 3 tipos de bombas, cada una con sus propias ventajas y desventajas: bombas recíprocas, bombas de jeringa o desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante.

***Bombas recíprocas o de vaivén***, son las más utilizadas. Están formadas por una pequeña cámara cilíndrica que se llena y luego se vacía por oscilación de un pistón de zafiro. El bombeo produce un flujo pulsado que después debe amortiguarse. Sus principales ventajas son que se consiguen presiones elevadas y se suministra un caudal constante, consiguiéndose adaptar a la técnica de elución con gradiente, debido a su pequeño volumen interno <sup>(19)</sup>.

**Bombas neumáticas o de presión constante**, hacen uso de la presión de un gas aplicado al recipiente conteniendo la fase móvil. Son sencillas, no provocan pulsaciones pero están limitadas a presiones relativamente bajas.

**Bombas de desplazamiento o tipo jeringa**, consisten en una cámara equipada con un mecanismo de tornillo. Suministran un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad limitada a unos 250 mL.

Características de las bombas:

- Caudal: Los equipos convencionales operan con caudales entre 0,1 y 10 mL/ min y trabajan con presiones de hasta 6000 psi.
- Exactitud en el caudal: La exactitud en la medición del caudal se refiere a la divergencia entre el caudal de trabajo establecido y el caudal real entregado.
- Ruido: Se refiere a las variaciones denominadas pulsaciones que presentan las bombas del tipo recíprocante y que conducen a variaciones en el caudal del solvente entregado en intervalos cortos de tiempo.
- Deriva: Es un cambio continuo (Positivo o negativo) en la entrega de solvente que se produce en intervalos de tiempo muy largos (Típicamente durante horas).

## **b. Inyectores**

Después de ser disueltos en la fase móvil u otra solución apropiada, los compuestos que se van a cromatografiar se inyectan en la fase móvil, ya sean manualmente usando jeringas o inyectores de espiral o bien automáticamente mediante el uso de inyectores automáticos. Estos últimos constan de un carrusel o una gradilla para sostener los viales de muestra cuya parte superior se encuentra tapada con un septo o un perforable y un dispositivo de inyección para transferir las muestras desde los viales a un espiral conectado al cromatógrafo. Los inyectores automáticos pueden programarse para controlar el volumen de muestreo, el número de inyecciones, y los ciclos de

enjuague del espiral, el intervalo entre las inyecciones y otras variables operativas. <sup>(17)</sup>

### **c. Detectores**

La mayoría de métodos de HPLC usados actualmente requieren del uso de detectores espectrofotométricos. Este tipo de detector consta de una celda de flujo colocada en el extremo de la columna. Un haz de radiación UV pasa a través de la celda de flujo y se introduce en el detector. A medida que los compuestos eluyan de la columna, pasan a través de la celda y absorben la radiación lo que da lugar a cambios cuantificables en el nivel de energía. <sup>(17)</sup>

Existen detectores de longitud de onda fija, variable y múltiple; siendo el más utilizado los detectores de longitud de onda variable, porque permiten seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo, escogiendo la mayor absorción del analito. Para la investigación de desarrollo de técnicas analíticas se recomienda utilizar el detector de arreglo de diodos que emplea un conjunto de fotodiodos, para conseguir la luz transmitida en todo el espectro de absorción del eluido en tiempo real. <sup>(17)</sup>

Los detectores de longitud de onda variable contienen una fuente de luz continua, como una lámpara de deuterio o de xenón de alta presión y un monocromador o un filtro de interferencia para generar radiación monocromática a una longitud de onda seleccionada por el operador.

Los detectores nos permiten ver y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

Los detectores deben de reunir ciertas características tales como:

- Tener un amplio rango de respuesta.
- Poseer una respuesta lineal.
- No contribuir al ensanchamiento de la banda extracolumnar.
- Responder a todos los solutos.
- Tener sensibilidad apropiada.
- No afectarse por los cambios de temperatura.
- Poseer una buena relación señal/ruido.

- No destruir la muestra.

### **Detector de luz ultravioleta**

Es el detector más empleado en HPLC, posee buena sensibilidad y rango lineal, el cual le permite detectar analitos en el orden de los nanogramos, no es destructivo y puede emplearse con gradientes de solventes con la única limitación de que estos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo de 190 a 350 nm y en algunos equipos se puede extender a la zona visible del espectro (350 a 700 nm) recibiendo así el nombre de detector UV/ Vis. <sup>(19)</sup>

La fuente de iluminación es una lámpara de deuterio de arco de descarga para el rango de longitud de onda ultravioleta (UV). Su luz es enfocado por un espejo de la lámpara en la entrada de la celda de flujo de cartucho Max-luz con guías de ondas optofluídicas. La luz sale de la celda de flujo de cartucho Max-luz en el otro lado y se centra por el espejo plegable a través del conjunto de hendidura en una luz rejilla holográfica que se dispersa en la matriz de diodos. Esto permite el acceso simultáneo a toda la información de longitud de onda.

La fuente de luz para el rango UV de longitud de onda es una lámpara de UV de toda la vida con la etiqueta RFID. Como resultado de la descarga de plasma en deuterio gaseoso de baja presión, la lámpara emite luz sobre el 190 nm a aproximadamente el rango de longitud de onda de 800 nm. El principio óptico de la celda de cartucho Max-Light se basa en guías de ondas optofluídico. Casi el 100% de transmisión de luz se logra mediante la utilización de la reflexión interna total en una fibra de sílice no revestido. Compromete índice de refracción y efectos térmicos están casi completamente eliminado, lo que resulta en mucho menos la deriva de línea de base.

La combinación de la imagen de dispersión y espectro se logra mediante el uso de una red de difracción holográfica cóncava. La rejilla separa el haz de luz en todos sus componentes de longitudes de onda y refleja la luz sobre la serie de fotodiodos. La matriz de diodos es una serie de 1.024 fotodiodos individuales y circuitos de control situados en un soporte de cerámica. Tiene

un rango de longitud de onda 190 a 640 nm y el intervalo de muestreo es 0,5 nm.<sup>(23)</sup>

#### **d. Sistema de Cromatografía Líquida**

##### **- Fase Estacionaria y Fase Móvil.**

Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación se logra por la partición de los compuestos presentes en la solución de prueba entre la fase móvil y la estacionaria.

Los sistemas que constan de fases estacionarias polares y fases móviles no polares se describen como de fase normal, por el contrario, cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina cromatografía en fase reversa.

La cromatografía de partición se emplea para compuestos solubles en hidrocarburos de peso molecular menor de 1000. La afinidad de un compuesto por la fase estacionaria, y por consiguiente su tiempo de retención en la columna se controla mediante una fase móvil regularmente polar. La polaridad de la fase móvil puede variar mediante el agregado de un segundo y, a veces, un tercer o hasta un cuarto componente.<sup>(11)</sup>

Las columnas para cromatografía de líquidos se construyen normalmente con tubos de acero inoxidable de diámetro interno uniforme, tienen una longitud entre 10 y 30 cm. Por lo común, las columnas son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm; y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son de 3,5 a 10  $\mu\text{m}$  de formas irregulares o esféricas.<sup>(15) (16)</sup>

Las fases estacionarias para la moderna cromatografía de líquidos de fase reversa constan normalmente de una fase orgánica químicamente unida a sílice u otros materiales. La sílice o también llamado silicagel es un sólido amorfo y poroso de gran área superficial (30 a 500  $\text{m}^2$ ) y alto volumen de poro (0,4 a 1,2  $\text{mL/g}$ ), de diámetro de poro entre 60 a 300  $\text{\AA}$ ,

químicamente es un óxido de silicio hidratado ( $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), sus átomos internos ligados por  $\text{O}_2$  y los superficiales por  $\text{OH}$ .

La partícula de la fase ligada está compuesta por un material de base: silicagel, alúmina, agarosa, copolímero de estireno, que se unen químicamente a un compuesto con un grupo funcional determinado. La unión más frecuente es la de silicagel por medio de una unión covalente tipo siloxano  $\text{Si-O-R}$ .<sup>(17)</sup>

Las partículas pequeñas recubiertas con una capa delgada de fase orgánica proporcionan una baja resistencia a la transferencia de masa y, por lo tanto, se obtiene una transferencia rápida de los compuestos entre la fase estacionaria y la móvil. La polaridad de la columna depende de la polaridad de los grupos funcionales unidos, que varía desde el octadecilsilano, relativamente no polar a grupos nitrilos muy polares.

Las fases estacionarias líquidas no unidas deben ser en gran medida inmiscibles con la fase móvil. Aún así, generalmente es necesario saturar previamente la fase móvil con la fase estacionaria para impedir la redisolución de la fase estacionaria de la columna. Las fases estacionarias poliméricas recubiertas sobre el soporte son más duraderas.

Las columnas pueden calentarse para proporcionar separaciones más eficaces pero rara vez se las utiliza a temperaturas por encima de los  $60^\circ\text{C}$ , debido a la potencial degradación de la fase estacionaria o la volatilidad de la fase móvil.<sup>(11)</sup>

#### - **Columna**<sup>(13)</sup>

Una buena cromatografía con fases móviles interactivas, requieren de un equilibrio adecuado entre las fuerzas intermoleculares existentes entre los 3 participantes activos en el proceso de la separación: el soluto, la fase móvil y la fase estacionaria.

Estas fuerzas intermoleculares se describen cualitativamente en términos de polaridad relativa de cada uno de los reactivos. Las polaridades en orden creciente para varios grupos funcionales del analito son:

Hidrocarburos < éteres < esterres < cetonas < aldehídos < amidas < aminas < alcoholes.

El agua es más polar que cualquier compuesto que contenga algunos de los anteriores grupos funcionales.

Al elegir una columna para una separación cromatográfica de reparto, la polaridad de la fase estacionaria debe ser bastante similar a la de los analitos, y para la elución se utilizan, entonces, una fase móvil con una polaridad considerablemente distinta. Este procedimiento por lo general resulta más adecuado que si las polaridades del soluto y de la fase móvil son parecidas pero difieren mucho con respecto a la fase estacionaria.

En este caso, la fase estacionaria a menudo no puede competir efectivamente por los componentes de la muestra, y los tiempos de retención se hacen demasiado cortos para las aplicaciones prácticas. En el otro extremo, por supuesto, se encuentra el caso en que las polaridades del soluto y la fase estacionaria sean demasiado parecidas y totalmente distintas de la fase móvil. En estas circunstancias, los tiempos de retención se hacen excesivamente largos. En resumen, si se quieren obtener buenas separaciones en un tiempo razonable, las polaridades del soluto, de la fase móvil y de la fase estacionaria se han de armonizar cuidadosamente. Sin embargo, las teorías que relacionan las interacciones de la fase móvil y de la fase estacionaria con una serie determinada de componentes de una muestra son imperfectas, y en el mejor de los casos, un científico sólo puede elegir la fase estacionaria de manera general. Una vez hecha la elección, el científico ha de realizar una serie de ensayos tentativos obteniendo los cromatogramas con varias fases móviles hasta que se llegue a una separación satisfactoria. Si la resolución de todos los componentes de la mezcla resulta imposible, se ha de elegir otro tipo de columna.

- **Diámetro interior**

Se empieza con un diámetro interior de 4 mm, el cual es óptimo para la eficacia separadora. La elección del diámetro de la columna dependerá de

la concentración de un componente en el efluente y del volumen de fase móvil que debe consumirse en un análisis, todo lo cual se puede relacionar con la velocidad de la fase móvil. Se puede reducir el diámetro de la columna a 1-2 mm si se trata de volúmenes de muestra muy pequeña si se quiere gastar menores disolventes o si se requiere una gran sensibilidad de detección.

- **Longitud**

Se empieza con columnas de 125 mm. Se prolonga con un múltiplo en caso de requerirse un número de platos más elevados para la resolución de los componentes. Se emplearán columnas aún más cortas para problemas de separación muy rápidos pero sencillos, reduciéndose el tiempo de análisis.

El punto de partida para el desarrollo de métodos es el uso de una fase móvil tamponada a bajo pH, en torno a pH 2-3. El uso de una fase móvil de pH bajo proporciona generalmente las mejores formas de pico para compuestos básicos en columnas basadas en sílice. A pH bajo, los silanoles de la sílice están completamente protonados, por lo que los compuestos básicos con carga positiva no interaccionan de forma notoria. El resultado es una buena forma de pico. Muchos compuestos ácidos no están cargados, lo que maximiza su retención a pH bajo.

Se comienza el desarrollo de métodos con acetonitrilo como modificador orgánico de la fase móvil y tampón fosfato 20-50 mM (pH 2-3) como componente acuoso para aplicaciones no LC/MS. Esas condiciones proporcionan el buen control del pH necesario para obtener los análisis más reproducibles de compuestos ionizables. <sup>(24)</sup>

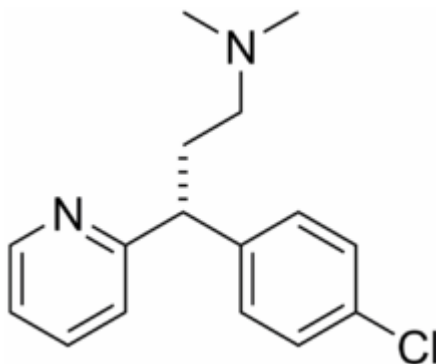


## 4.5. PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DEL ANALITO

### 4.5.1. CLORFENAMINA MALEATO

#### Propiedades físicas y químicas:

Formula estructural



**Nombre químico:** 3-(4-clorofenil)-N,N-dimetil-3-piridin-2-il-propan-1-amina

**Formula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>Cl

**Peso molecular:** 274.788 g/mol

**Solubilidad:** Fácilmente soluble en agua (0.55 g/100 mL, líquido mg/mL (20 °C)), soluble en alcohol y en cloroformo; poco soluble en éter y en benceno

**Descripción:** Polvo cristalino blanco, inodoro. Sus soluciones tienen un pH entre 4 y 5. Libre de partículas extrañas

#### Propiedades farmacológicas:

La clorfenamina se puede administrar por vía oral, subcutánea, intramuscular o intravenosamente. Por vía oral, este fármaco se absorbe bastante bien. Los alimentos retrasan su absorción, pero sin afectar la biodisponibilidad. El comienzo de la acción antialérgica de la clorfenamina se observa a los 30-60 minutos y es máxima a las 6 horas, mientras que las concentraciones plasmáticas máximas se detectan a las 2 horas de la administración. La duración de los efectos terapéuticos oscila entre las 4 y 8 horas. La clorfenamina se une a las proteínas del plasma en un 72%, se distribuye bien

por los tejidos y fluidos del organismo, cruza la barrera placentaria y se excreta en la leche.

El fármaco se metaboliza extensa y rápidamente, primero en la misma mucosa gástrica y luego en su primer paso por el hígado: se producen varios metabolitos N-desalquilados que se eliminan en la orina conjuntamente con el fármaco sin alterar. La semi-vida plasmática es de 2 a 4 horas, si bien la semi-vida de eliminación varía según la edad de los pacientes, en los adultos sanos es de 20 a 24 horas, mientras que en los niños, se reduce a la mitad. En los pacientes con insuficiencia renal, la semi-vida de eliminación depende del grado de la insuficiencia pudiendo llegar a las 300 horas o más en los pacientes bajo hemodiálisis. La velocidad de la eliminación depende del pH y de la cantidad de orina excreta, disminuyendo cuando el pH aumenta.

## **V. PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.1. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS**

Se contaron con equipos y materiales debidamente calibrados y/o calificados. Los reactivos que se usaron, fueron de alta pureza, especificados para Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).

#### **Equipos:**

- Cromatógrafo Líquido de Alta Performance: Agilent Technologies 1200 DAD y/o Lachrom Elite Merck Hitachi
- Balanza analítica Mettler Toledo XD 105 UD y XS204
- Agitador Magnético
- Bomba al vacío
- Estufa
- Potenciómetro Mettler Toledo
- Baño de María GLF 21132
- Baño de ultrasonido Elma S-70
- Computadora
- Impresora

#### **Materiales:**

- Beakers de vidrio de 1 litro.
- Beakers de 250 y 500 mL.
- Fiolas de 25, 50, 200 y 500 mL.
- Pipetas no volumétricas de 2, 5 y 10 mL.
- Pipetas volumétricas de 1, 3, 4, 5, 6 y 7 mL.
- Probetas de vidrio de 100, 500 y 1000 mL.
- Jeringas de 10 mL y portafiltro.
- Espátulas
- Pissetas
- Viales de HPLC de 2 mL, con tapas rosca y septas de silicona.

- Membranas de Poliamida y PVDF para filtración de 0,45 um marca Sartorius y Millipore.
- Columna cromatográfica Lichrospher C18, 125mm x 4,0 mm, 5um

**Reactivos:**

- Agua HPLC
- Metanol HPLC
- Agua purificada
- Lauril sulfato de sodio P.A.
- Trietilamina P.A:
- Acido fosfórico al 85%
- Acetonitrilo HPLC
- Peróxido de hidrogeno P.A.
- Acido Clorhídrico 37% P.A.
- Hidróxido de sodio P.A.

**Estándar de referencia de Clorfenamina Maleato:**

- Potencia: 99,70% T/C
- Lote: 33000393
- Fecha de fabricación: 2013-02-18
- Fecha de vencimiento: 2015-02-28

## **5.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

Se desarrollo la validación del método analítico siguiendo estrictamente el Procedimiento de Operación Estándar (SOP) del Laboratorio TEVA PERU S.A.

### **5.2.1. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN**

#### **a. OBJETIVO**

Definir el alcance, responsabilidades, parámetros de validación, criterios de aceptación y procedimiento a seguir a fin de validar el método analítico para el producto terminado: Clorfenamina Maleato 4 mg Tabletas.

#### **b. ALCANCE.**

Aplica al método analítico implementado y Validado en laboratorio de Teva Perú: Control de Calidad – Planta N°1 San Miguel y Planta N°2 Ate.

#### **c. CONSIDERACIONES PRELIMINARES**

c.1. La presente validación será desarrollada tomando como sustento los siguientes documentos.

- Política de Validación de Métodos Analíticos para Producto Terminado (VAL-OTR-008).
- N° Control de cambio: 0000001234

c.2 La presente validación implicará la realización de las siguientes actividades generales:

- Revisión y optimización previa de la metodología analítica, si aplica y es necesario.
- Validación de la metodología analítica según los criterios establecidos en el punto **E**).
- Reporte de Validación al cabo de la validación del método analítico.
- Mantenimiento de la validación mediante el procedimiento de control de cambios

#### **d. RESPONSABILIDADES**

- DCA Director de Calidad (CV)
- GCC Gerencia de Control de Calidad (CV)
- SGV Sub-Gerencia de Validaciones (CV)

- JCC Jefatura de Control de Calidad – Planta N° 1 y Planta N°2
- Analista de Control de calidad

## **e. PROCEDIMIENTO**

### **e.1. Descripción de la Metodología Analítica.**

A continuación se detallan los factores de variación relacionados con la metodología analítica en cuestión, los cuales se verificarán durante el desarrollo de la validación:

#### **e.1.1. Método Analítico.**

Durante el desarrollo de las operaciones unitarias, que conforman el método analítico, no se deberán presentar cambios mayores o críticos que afecten la variabilidad de los resultados del método

#### **e.1.2. Personal**

El personal directamente involucrado con las operaciones del método analítico en cuestión deberá haber sido entrenado en las labores establecidas.

#### **e.1.3. Instrumentos / Equipos de Medición.**

Los instrumentos / equipos de medición empleados deberán poseer, según aplique, certificado de mantenimiento, calibración ó verificación vigente.

#### **e.1.4. Estándares, Reactivos y Otros Materiales.**

Los reactivos y otros materiales empleados durante el desarrollo de la validación del método analítico deberán ser identificados con marca y lote así como poseer fecha de vencimiento y/o certificado según aplique.

Los estándares secundarios deberán tener, según aplique, una referencia diferente a la materia prima utilizada para el lote y/o piloto del producto empleado en la validación.

#### **e.1.5. Fórmula Cualitativa / Cuantitativa del Producto.**

La fórmula cualitativa / cuantitativa del producto involucrado con la validación del método analítico en cuestión debe ser definida, aprobada y no sufrir cambios mayores o críticos que afecten la validez del método analítico. La preparación del placebo necesario para la ejecución de la validación debe documentarse y evidenciar que es similar en fórmula como en operaciones de preparación al producto.

### **5.2.2. TÉCNICA ANALÍTICA DESARROLLADA**

#### **Condiciones Cromatográficas:**

Equipo : Cromatografía de Alta Performance HPLC

Columna : Lichrospher C18, 125mm x 4,0 mm, 5µm

Longitud de Onda : 265 nm

Flujo : 1,0 mL/min.

Vol. de Inyección : 40 µL.

Temperatura : 30°C

#### **Procedimiento:**

Al cromatografiar los estándares y muestras, evaluar que se cumpla lo siguiente:

La DSR de los replicados del Estándar y Muestras debe ser no mayor de 2,0%

La eficiencia de la columna no es menos de 1500 platos teóricos para Clorfenamina Maleato.

Factor de asimetría (USP tailing) no es mayor de 2,0.

#### Secuencia de Inyecciones

Estándar 1	: 5 inyecciones
Estándar 2	: 2 inyecciones
Muestras	: 2 inyecciones por muestra
Estándar 2	: 1 inyección

#### **Preparación de Fase Móvil:**

Disolver 2.88 g de lauril sulfato de sodio en 400 mL de agua, adicionar 1 mL de trietilamina y ajustar con ácido fosfórico a un pH de  $2.85 \pm 0.05$ . Agregar 600 mL de acetonitrilo. Filtrar por membrana de PVDF de 47mm x 0.45µm.

#### **Preparación del Estándar:**

Pesar con exactitud y por duplicado aproximadamente 20 mg de Estándar de Clorfenamina Maleato y transferir a una fiola de 50 mL, añadir 30 mL de agua purificada y sonicar por 10 minutos o hasta disolución, llevar a temperatura ambiente, enrasar con agua purificada y homogeneizar.

Transferir una alícuota de 5,0 mL a una fiola de 25 mL, enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45 µm de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

Conc. Teórica Final: 0.080 mg/mL

#### **Preparación de Muestra:**

Triturar 20 tabletas a polvo fino y pesar aproximadamente una cantidad de polvo equivalente a 1 tableta (aprox. 212 mg), transferir a una fiola de 50 mL, añadir 30 mL de agua purificada; sonicar durante 10 minutos y agitar magnéticamente durante 20 minutos; llevar a temperatura ambiente, enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45 µm de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

Conc. Teórica Final: 0.080 mg/mL



**Especificaciones:**

Presentación: Clorfenamina Maleato 4 mg Tabletas

Cantidad declarada: 4,00 mg por tableta

Especificación: 3,60 mg – 4,40 mg (90,0 % - 110,0 %)

**Cálculos:**

Los cálculos que se aplican para la determinación de los principios activos en la muestra se realiza siguiendo la fórmula tal cual se detalla:

$$\% \text{ Clorfenamina Maleato} = \frac{\text{AMP} \times \text{WSt} \times 5 \times \text{Pot St} \times 50 \times \text{PP} \times 100}{\text{ASt} \times 50 \times 25 \times 100 \times \text{PM} \times \text{C}}$$

Donde:

AMP = Área de la muestra.

ASt = Área del estándar.

WSt = Peso del estándar de Clorfenamina Maleato en mg.

Pot St = Potencia del Clorfenamina Maleato (tal cual)

PM = Peso de la muestra

C = Concentración de Clorfenamina Maleato

PP = Peso Promedio

### 5.2.3. PARÁMETROS A VALIDAR

**Tabla N° 2: Parámetros de la Validación**

PARÁMETROS
ESPECIFICIDAD <sup>(3)</sup>
LINEALIDAD DE SISTEMA
LINEALIDAD DE METODO
EXACTITUD
REPETIBILIDAD
PRECISION INTERMEDIA <sup>(1)</sup>
ROBUSTEZ <sup>(2)</sup>
RANGO
ESTABILIDAD DE SISTEMA <sup>(4)</sup>
ESTABILIDAD DE METODO <sup>(4)</sup>

(1) Se realiza empleando otro analista y otro equipo HPLC.

(2) Se determinarán las variables a analizar de acuerdo a la descripción del método empleando otro tipo de membrana.

(3) Para la evaluación de este parámetro, se someterá al analito a estrés como degradación ácida, alcalina, oxidación, termólisis, rayos UV y acelerada; sólo para las Técnicas Analíticas Internas.

(4) El estándar y las muestras se deben mantener estables dentro de las 24 horas de su preparación.

## 5.2.4. DESARROLLO DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

### 5.2.4.1. ESPECIFICIDAD

Mediante este parámetro se determina la capacidad del método analítico de medir el contenido de Clorfenamina Maleato sin interferencia de parte de los excipientes presentes o de posibles productos de degradación del principio activo.

El volumen de inyección que se utiliza es de 40 µL.

- Se realiza una inyección por cada muestra.
- El tiempo de corrida por cada inyección es de 2,8 minutos.

### A) DETERMINACIÓN DE PICOS

Se determina inyectando la solución placebo, estándar y placebo cargado.

#### - **Placebo:**

Transferir 832 mg de placebo a una fiola de 200 mL, añadir 120 mL de agua purificada; sonicar durante 10 minutos y agitar magnéticamente durante 20 minutos; tratar los productos de degradación a baño maría durante una hora a 80°C. Transcurrido el tiempo dejar enfriar a temperatura ambiente y enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45 µm de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

#### - **Estándar:**

Pesar 20,0 mg de Clorfenamina Maleato estándar de referencia a una fiola de 50 mL, añadir 30 mL de agua purificada y sonicar durante 10 minutos hasta disolución completa, enrasar con agua purificada y homogeneizar. Transferir 5 mL de la solución a una fiola de 25 mL, agregar 10 mL de agua purificada y tratar los productos de degradación a baño maría durante una hora a 80°C. Transcurrido el tiempo dejar enfriar a temperatura ambiente y enrasar con agua purificada y

homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45  $\mu\text{m}$  de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

- **Placebo Cargado:**

Transferir 16,0 mg de Clorfenamina Maleato estándar de referencia y 832 mg de placebo a una fiola de 200 mL, añadir 120 mL de agua purificada; sonicar durante 10 minutos y agitar magnéticamente durante 20 minutos; tratar los productos de degradación a baño maría durante una hora a 80°C. Transcurrido el tiempo dejar enfriar a temperatura ambiente y enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45  $\mu\text{m}$  de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

## **B) DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN**

El placebo, estándar y placebo cargado se someten a una degradación forzada, las cuales son:

1. **Tratamiento con Hidróxido de Sodio 2N:** Se le adiciona 1 mL de Hidróxido de Sodio 2N a las fiolas para su degradación y al término de esta se neutraliza con 1 mL de Ácido Clorhídrico 2N; llevar a temperatura ambiente y enrasar con su respectivo diluyente.
2. **Tratamiento con Ácido Clorhídrico 2N:** Se le adiciona 1 mL de Ácido Clorhídrico 2N a las fiolas para su degradación y al término de esta se neutraliza con 1 mL de Hidróxido de Sodio 2 N; llevar a temperatura ambiente y enrasar con su respectivo diluyente.
3. **Tratamiento con Peróxido de Hidrógeno 10 volúmenes:** Se le adiciona 1 mL de Peróxido de Hidrógeno a las fiolas para su degradación; llevar a temperatura ambiente y enrasar con su respectivo diluyente.
4. **Tratamiento con Luz UV:** Se expone a las fiolas a la luz ultravioleta 254 nm por una hora, al término enrasar con su respectivo diluyente.

5. **Tratamiento con calor:** Se lleva a las fiolas a baño maría por 1 hora, al término llevar a temperatura ambiente y enrasar con su respectivo diluyente.
6. **Tratamiento acelerado:** Se lleva a solución saturada de Cloruro de Sodio a una estufa a 70°C por 3 días (100% de humedad relativa (HR)), se coloca una porción de estándar y placebo durante este periodo; al término se realiza la preparación de placebo, estándar y placebo cargado según se indica en la determinación de picos.

El tiempo de corrida para las muestras sometidas a estrés deben ser por lo menos 2 veces el tiempo de retención del pico principal.

**Especificaciones:**

- La respuesta de cualquier señal de interferencia con el analito debe ser  $\leq 0,5\%$  de la respuesta del analito.
- Para las condiciones de degradación no se detectan picos que interfieran con el pico principal.

**5.2.4.2. LINEALIDAD**

**a. LINEALIDAD DE SISTEMA**

La linealidad de sistema se determina empleando soluciones de trabajo, en un rango de cinco concentraciones de 60%; 80%; 100%; 120% y 140%; siendo el 100% la concentración final de 0.080 mg/mL de Clorfenamina Maleato.

**Preparación de la solución madre:**

Pesar con exactitud aproximadamente 20 mg de Estándar de Clorfenamina Maleato y transferir a una fiola de 50 mL, añadir 30 mL de agua purificada y sonicar por 10 minutos o hasta disolución, llevar a temperatura ambiente y enrasar con agua purificada y homogeneizar.

**Solución al 60% (0.048 mg/mL de Clorfenamina Maleato):**

Transferir 3 mL de la solución madre a una fiola de 25 mL, enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45 um de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

**Solución al 80% (0.064 mg/mL de Clorfenamina Maleato):**

Transferir 4 mL de la solución madre a una fiola de 25 mL, enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45 um de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

**Solución al 100% (0.080 mg/mL de Clorfenamina Maleato):**

Transferir 5 mL de la solución madre a una fiola de 25 mL, enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45 um de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

**Solución al 120% (0.096 mg/mL de Clorfenamina Maleato):**

Transferir 6 mL de la solución madre a una fiola de 25 mL, enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45 um de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

**Solución al 140% (0.112 mg/mL de Clorfenamina Maleato):**

Transferir 7 mL de la solución madre a una fiola de 25 mL, enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45 um de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

**b. LINEALIDAD DE MÉTODO**

La linealidad de Método se determina en un rango de cinco concentraciones de 60%; 80%; 100%; 120% y 140%; siendo el 100% la concentración final de 0.080 mg/mL de Clorfenamina Maleato.

**Solución al 60% (0.048 mg/mL de Clorfenamina Maleato):**

Triturar a polvo fino las tabletas y pesar aproximadamente 127,2 mg de polvo de muestra y transferir a una fiola de 50 mL, añadir 30 mL de agua purificada, sonicar durante 10 minutos y agitar magnéticamente durante 20 minutos; llevar a temperatura ambiente y enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45 um de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

**Solución al 80% (0.064 mg/mL de Clorfenamina Maleato):**

Triturar a polvo fino las tabletas y pesar aproximadamente 169,6 mg de polvo de muestra y transferir a una fiola de 50 mL, añadir 30 mL de agua purificada, sonicar durante 10 minutos y agitar magnéticamente durante 20 minutos; llevar a temperatura ambiente y enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45 um de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

**Solución al 100% (0.080 mg/mL de Clorfenamina Maleato):**

Triturar a polvo fino las tabletas y pesar aproximadamente 212,0 mg de polvo de muestra y transferir a una fiola de 50 mL, añadir 30 mL de agua purificada, sonicar durante 10 minutos y agitar magnéticamente durante 20 minutos; llevar a temperatura ambiente y enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45 um de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

**Solución al 120% (0.096 mg/mL de Clorfenamina Maleato)**

Triturar a polvo fino las tabletas y pesar aproximadamente 254,4 mg de polvo de muestra y transferir a una fiola de 50 mL, añadir 30 mL de agua purificada, sonicar durante 10 minutos y agitar magnéticamente durante 20 minutos; llevar a temperatura ambiente y enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45 um de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

**Solución al 140% (0.112 mg/mL de Clorfenamina Maleato):**

Triturar a polvo fino las tabletas y pesar aproximadamente 296,8 mg de polvo de muestra y transferir a una fiola de 50 mL, añadir 30 mL de agua purificada, sonicar durante 10 minutos y agitar magnéticamente durante 20 minutos; llevar a temperatura ambiente y enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45  $\mu$ m de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

**Especificaciones:**

- El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la regresión lineal debe ser  $\geq 0,997$ .
- La relación (y-intercepto / respuesta al 100% de la concentración de trabajo) x 100 debe ser  $\leq 3,0\%$ .

**5.2.4.3. EXACTITUD**

Pesar la cantidad de principio activo y placebo y proceder según el método analítico a partir de las cuales se realizan las soluciones de lectura dentro del rango a estudiar (60%; 100%; 140%), obteniéndose 9 determinaciones por cada solución de lectura.

**Solución al 60% (0,048 mg/mL de Clorfenamina Maleato):**

Transferir 24,0 mg de Clorfenamina Maleato estándar de referencia y 2096,0 mg de placebo a una fiola de 500 mL, añadir 300 mL de agua purificada; sonicar durante 10 minutos y agitar magnéticamente durante 20 minutos; llevar a temperatura ambiente y enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45  $\mu$ m de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

Proceder de la misma manera con la EXM-60-2 y EXM-60-3.



**Solución al 100% (0.080 mg/mL de Clorfenamina Maleato):**

Transferir 16,0 mg de Clorfenamina Maleato estándar de referencia y 832,0 mg de placebo a una fiola de 200 mL, añadir 120 mL de agua purificada; sonicar durante 10 minutos y agitar magnéticamente durante 20 minutos; llevar a temperatura ambiente y enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45 µm de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

Proceder de la misma manera con la EXM-100-2 y EXM-100-3.

**Solución al 140% (0.112 mg/mL de Clorfenamina Maleato):**

Transferir 22,4 mg de Clorfenamina Maleato estándar de referencia y 825,6 mg de placebo a una fiola de 200 mL, añadir 120 mL de agua purificada; sonicar durante 10 minutos y agitar magnéticamente durante 20 minutos; llevar a temperatura ambiente y enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45 µm de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

Proceder de la misma manera con la EXM-140-2 y EXM-140-3.

**Especificaciones:**

- El intervalo de confianza del promedio de la recuperación de cada nivel de concentración evaluado debe estar dentro de 97% - 107% a un nivel de confianza del 95,0%.

**5.2.4.4. PRECISIÓN (Repetibilidad / Precisión Intermedia)**

El estudio de la precisión se realiza siguiendo el método analítico desarrollado para el producto. Se realiza 2 precisiones, las cuales son desarrolladas en días diferentes, por analistas diferentes (Repetibilidad: Giovani Chumioque, analista de control de calidad y Precisión Intermedia: Diana Mendoza, analista de control de calidad) y por equipo HPLC diferente (Repetibilidad: Agilent DAD-2 1200 y Precisión Intermedia: Merck Hitachi LaChrom Elite).

Además los ensayos de precisión se realizan utilizando las muestras del lote en específico y los estándares de Clorfenamina Maleato especificado.

#### **Preparación de Fase Móvil:**

Disolver 2.88 g de lauril sulfato de sodio en 400 mL de agua, adicionar 1 mL de trietilamina y ajustar con ácido fosfórico a un pH de  $2.85 \pm 0.05$ . Agregar 600 mL de acetonitrilo. Filtrar por membrana de PVDF de 47mm x 0.45µm.

#### **Preparación del estándar de referencia:**

Pesar con exactitud y por duplicado aproximadamente 20,0 mg de Estándar de Clorfenamina Maleato y transferir a una fiola de 50 mL, añadir 30 mL de agua purificada y sonicar por 10 minutos o hasta disolución, llevar a temperatura ambiente y enrasar con agua purificada y homogeneizar.

Transferir una alícuota de 5,0 mL a una fiola de 25 mL, enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45 µm de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

#### **Preparación de la solución muestra:**

Triturar 20 tabletas a polvo fino y pesar por sextuplicado aproximadamente una cantidad de polvo equivalente a 1 tableta (aprox. 212 mg), transferir a una fiola de 50 mL, añadir 30 mL de agua purificada; sonicar durante 10 minutos y agitar magnéticamente durante 20 minutos; llevar a temperatura ambiente y enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45 µm de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

#### **Especificaciones:**

- La DSR de los resultados de las muestras debe ser  $\leq 3,0\%$ .
- El límite superior del intervalo de confianza de la diferencia de promedios de valoración obtenido entre las distintas condiciones analíticas (Repetibilidad y Precisión Intermedia) debe ser  $\leq 4,0\%$ .

#### **5.2.4.5. RANGO**

Cumplidas las especificaciones de linealidad del sistema, linealidad del método, precisión y la exactitud, queda establecido que el rango de este método analítico es de 60 % a 140 %, verificándose que el método analítico funciona correctamente cuando se aplican a muestras que contienen principio activo a concentraciones iguales a los extremos superior e inferior, así como dentro del intervalo de concentración definido.

##### **Especificaciones:**

- Resultados conformes de linealidad, precisión y exactitud.

#### **5.2.4.6. ROBUSTEZ**

La robustez se realiza variando la membrana utilizada de PVDF por una membrana de Poliamida en el proceso de filtración de estándares y muestras. Cada solución muestra se inyecta por duplicado.

##### **Especificaciones:**

- La DSR de los resultados de las muestras debe ser  $\leq 3,0\%$ .
- El límite superior del intervalo de confianza de la diferencia de promedios de valoración obtenido entre las distintas condiciones analíticas (Repetibilidad y Robustez) debe ser  $\leq 4,0\%$ .

#### **5.2.4.7. ESTABILIDAD**

Las soluciones del estándar y la muestra son evaluadas dentro de un periodo aproximado de 24 horas, manteniéndolas en condiciones de almacenamiento apropiadas.

##### **Preparación del estándar de referencia:**

Pesar con exactitud y por duplicado aproximadamente 20,0 mg de Estándar de Clorfenamina Maleato y transferir a una fiola de 50 mL, añadir 30 mL de agua purificada y sonicar por 10 minutos o hasta disolución, llevar a temperatura ambiente y enrasar con agua purificada y homogeneizar.

Transferir una alícuota de 5,0 mL a una fiola de 25 mL, enrasar con agua purificada y homogeneizar. Filtrar antes de inyectar, utilizando membrana 0,45  $\mu$ m de poro (HV DURAPORE EN PVDF MILLIPORE o equivalente).

**Especificaciones:**

- La DSR de los resultados de las muestras debe ser  $\leq 3,0\%$ .
- La diferencia relativa con el estándar preparado en el momento debe ser  $\pm 2,0\%$  para la solución estándar y  $\pm 4,0\%$  para la solución de la muestra.

## VI. RESULTADOS

**Tabla N°3: Especificidad del analito**

### 6.1. ESPECIFICIDAD

ESPECIFICACIONES			
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS	
Degradación	Respuesta de cualquier señal de interferencia con el analito $\leq 0,5\%$	Conforme	Cumple

Los resultados cumplen la especificación

		ESPECIFICIDAD
SUSTANCIA	INTERFERENCIA	DISMINUCION ACTIVO
Placebo + D. Térmica	0,0%	N.A.
Placebo + D. Oxidativa	0,0%	N.A.
Placebo + D. Acida	0,0%	N.A.
Placebo + D. Alcalina	0,0%	N.A.
Placebo + D. UV	0,0%	N.A.
Placebo + D. Acelerado	0,0%	N.A.
Placebo Cargado+ D. Térmica	0,0%	2,9%
Placebo Cargado + D. Oxidativa	0,0%	3,4%
Placebo Cargado+ D. Acida	0,0%	3,5%
Placebo Cargado + D. Alcalina	0,0%	2,4%
Placebo Cargado + D. UV	0,0%	1,8%
Placebo Cargado + D. Acelerado	0,0%	2,0%
Estándar + D. Térmica	0,0%	1,9%
Estándar + D. Oxidativa	0,0%	16,7%
Estándar + D. Acida	0,0%	1,6%
Estándar + D. Alcalina	0,0%	1,7%
Estándar + D. UV	0,0%	1,1%
Estándar + D. Acelerado	0,0%	0,8%

Nota: En el cuadro de disminución de activo se reporta la cantidad de analito que se ha degradado en las muestras de placebo cargado y estándar, al ser sometidas a diversas condiciones de estrés.

No se encuentra ningún tipo de interferencia tanto en la determinación y cuantificación del analito.

## 6.2. LINEALIDAD

Linealidad de Sistema:

Tabla N°4: Concentración del Estándar vs Respuesta

Concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área Promedio
60%	0,0481	1189.90125
80%	0,0641	1586.64673
100%	0,0801	1994.20325
120%	0,0961	2391.65479
140%	0,1122	2756.20801

**Cálculo de la recta de regresión:**

Ecuación de la Recta:

$$y = bx + a$$

Donde:

x : Concentración de analito

y : Valor de la respuesta en área de pico cromatográfico

b : Valor de la pendiente de la recta

a: Valor del intercepto de la recta con el eje “y”

Fórmulas para hallar “b”

$$b = \frac{\sum (x-x)(y-y)}{\sum (x-x)^2} = \frac{\frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{n}}{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n}} = 24579$$

Fórmulas para hallar “a”

$$a = y - bx = \frac{\sum y - b \sum x}{n} = 14.47$$

**Tabla N°5: Resultados obtenidos del estudio de linealidad**

	<b>x (mg/mL)</b>	<b>y (Área)</b>	<b>xy</b>	<b>x<sup>2</sup></b>	<b>y<sup>2</sup></b>
	0.0481	1189.90125	57.23425	0.00231361	1415864.985
	0.0641	1586.64673	101.70406	0.00410881	2517447.846
	0.0801	1994.20325	159.73568	0.00641601	3976846.602
	0.0961	2391.65479	229.83803	0.00923521	5720012.635
	0.1122	2756.20801	309.24654	0.01258884	7596682.594
<b>Σ</b>	0.4006	9918.61403	857.75856	0.03466248	21226854.66
<b>P</b>	0.08012	1983.72281			

**Σ = Sumatoria; P = Promedio**

Para la interpretación estadística de la regresión lineal utilizamos el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación

#### **A. Coeficiente de Correlación (r)**

$$r = \frac{\sum(x-x)(y-y)}{\sum(x-x)^2 \sum(y-y)^2} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}}$$

$$r = 0,99993$$

Para n-2 grados de libertad (en este caso 5-2=3).

#### **B. Coeficiente de Determinación (r<sup>2</sup>)**

$$r^2 = 0,99957$$

La variable independiente explica un 99,99% de la varianza total y

### C. Test de Linealidad

#### - Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta

**Tabla N°6: Resultados obtenidos del Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta:**

x (mg/mL)	y (Área)	f (y/x)
0.0481	1189.90125	24738.07173
0.0641	1586.64673	24752.67910
0.0801	1994.20325	24896.42010
0.0961	2391.65479	24887.14662
0.1122	2756.20801	24565.13378
<b>Promedio</b>		24767.89026
<b>Desviación estándar</b>		135.067311
<b>Coeficiente de variación</b>		0.55

En una calibración lineal los factores de respuesta deben de ser semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente. Coeficiente de variación superior al 3,0% indican falta de linealidad.

### Test de Linealidad de la Pendiente b

**Significación estadística de la varianza de la pendiente b (Hipótesis nula: b = 0)**

**Varianza:**

$$S^2_{y.x} = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n-2} = 227.681009$$

$$S_{y.x} = 15.089$$

$$S_b^2 = \frac{S^2_{y.x}}{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2}{n}} = 88715.8273$$

$$S_b = 297.85$$

$$S_b \text{ rel.(\%)} = \frac{S_b \times 100}{b} = 1.21$$



**Límite de confianza:**

$$b \pm t_{sb} = 24579 \pm 3.182 \times 297.85$$

$$b \pm t_{sb} = 24579 \pm 947.759 \quad (\text{Entre } 25526.759 \text{ y } 23631.241)$$

El valor 3.182 es el valor de t para  $5-2=3$  grados de libertad y  $P = 0,05$  (intervalo de confianza del 95 %).

**Test de t:**

$$T_{\text{exp}} = \frac{|b|}{S_b} = \frac{24579}{297.85} = 82.521$$

$$T_{\text{exp}} > t_{\text{tablas}} \text{ incluso para } P = 0,001 (0,1\%)$$

Este valor tan alto indica que la probabilidad de ser  $b \neq 0$  es muy elevada, superior al 99,9 %. Si fuera  $b = 0$  significaría que la recta es paralela al eje de las abscisas y no habría regresión.

**Test de Proporcionalidad**

**Significación estadística de la varianza de la pendiente b (Hipótesis nula:  $a = 0$ )**

**Varianza:**

$$S^2_a = S^2_b \frac{\sum x^2}{n} = 2847.42124$$

$$S_a = 53.36$$

$$S_a \text{ rel.}(\%) = \frac{S_a \times 100}{a} = 369.2734$$

**Límite de confianza:**

$$a \pm t_{Sa} = 14.47 \pm 3.182 \times 53.36$$

$$a \pm t_{Sa} = 14.47 \pm 169.792 \quad (\text{Entre } 184.262 \text{ y } -155.322)$$

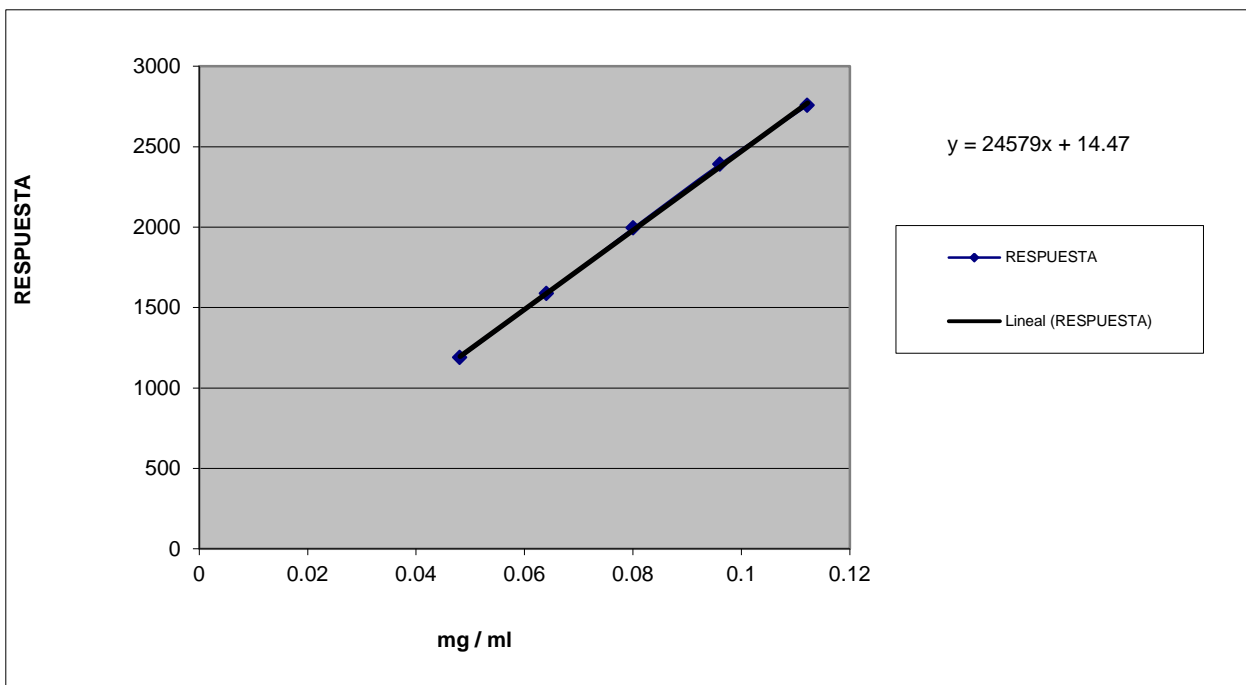
**Test de t:**

$$T_{\text{exp}} = \frac{|a|}{S_a} = 0.271$$

$$T_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}}$$

Este valor indica que la probabilidad de ser  $a \neq 0$  es muy elevada, mayor al 99,9 %.

Si  $a = 0$ , significa que la recta pasa por el origen de las coordenadas.



**Figura N°1: Representación gráfica de la linealidad de Sistema de Clorfenamina Maleato**

**Linealidad del Método:**

**Tabla N°7: Concentración de la Muestra vs Respuesta**

Concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área Promedio
60%	0.0478	1145.13733
80%	0.0638	1510.06580
100%	0.0797	1889.72498
120%	0.0956	2243.10425
140%	0.1116	2639.31812

**Cálculo de la recta de regresión:**

Ecuación de la Recta:

$$y = bx + a$$

Donde:

x : Concentración de analito

y : Valor de la respuesta en área de pico cromatográfico

b : Valor de la pendiente de la recta

a : Valor del intercepto de la recta con el eje “y”

Fórmulas para hallar “b”

$$b = \frac{\sum (x-x)(y-y)}{\sum (x-x)^2} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} = 23346$$

Formulas para hallar “a”

$$a = y - bx = \frac{\sum y - b \sum x}{n} = 24.76$$

**Tabla N°8: Resultados obtenidos del estudio de Linealidad**

	x (mg/mL)	y (Área)	xy	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>
	0.0478	1145.13733	54.73756	0.002285	1311340
	0.0638	1510.0658	96.34220	0.004070	2280299
	0.0797	1889.72498	150.61108	0.006352	3471061
	0.0956	2243.10425	214.44077	0.009139	5031517
	0.1116	2639.31812	294.54790	0.012455	6966000
<b>Σ</b>	0.3985	9427.35048	810.67951	0.03430129	19060215.5
<b>P</b>	0.0797	1885.470096			

**Σ = Sumatoria; P = Promedio**

Para la interpretación estadística de la regresión lineal utilizamos el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación

### A. Coeficiente de Correlación (r)

$$r = \frac{\sum(x-x)(y-y)}{\sum(x-x)^2 \sum(y-y)^2} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}}$$

$$r = 0,99994$$

Para n-2 grados de libertad (en este caso 5-2=3).

### B. Coeficiente de Determinación ( $r^2$ )

$$r^2 = 0,99977$$

La variable independiente explica un 99,99% de la varianza total y

### C. Test de Linealidad

#### - Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta

**Tabla N°9: Resultados obtenidos del Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta:**

x (mg/mL)	y (Área)	f (y/x)
0.0478	1145.13733	23956.84791
0.0638	1510.06580	23668.74295
0.0797	1889.72498	23710.47654
0.0956	2243.10425	23463.43358
0.1116	2639.31812	23649.80394
<b>Promedio</b>		23689.86098
<b>Desviación estándar</b>		176.795735
<b>Coeficiente de variación</b>		0.75

En una calibración lineal los factores de respuesta deben de ser semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente. Coeficiente de variación superior al 3,0% indican falta de linealidad.

### Test de Linealidad de la Pendiente b

Significación estadística de la varianza de la pendiente b (Hipótesis nula:  $b = 0$ )

Varianza:

$$S^2_{y.x} = \frac{\sum y^2 - a\sum y - b\sum xy}{n-2} = 107.414071$$

$$S_{y.x} = 10.364076$$

$$Sb^2 = \frac{S^2_{yx}}{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2}{n}} = 42275.02$$

$$Sb = 205.608901$$

$$Sb \text{ rel.(\%)} = \frac{Sb \times 100}{b} = 0.88$$

Límite de confianza:

$$b \pm t_{sb} = 23346 \pm 3.182 \times 205.6089$$

$$b \pm t_{sb} = 23346 \pm 654.25 \quad (\text{Entre } 24000.25 \text{ y } 22691.75)$$

El valor 3.182 es el valor de t para  $5-2=3$  grados de libertad y  $P = 0,05$  (intervalo de confianza del 95 %).

Test de t:

$$T_{\text{exp}} = \frac{|b|}{Sb} = \frac{23346}{205.61} = 113.55$$

$$T_{\text{exp}} > t_{\text{tablas}} \text{ incluso para } P = 0,001 (0,1\%)$$

Este valor tan alto indica que la probabilidad de ser  $b \neq 0$  es muy elevada, superior al 99,9 %. Si fuera  $b = 0$  significaría que la recta es paralela al eje de las abscisas y no habría regresión.

### Test de Proporcionalidad

Significación estadística de la varianza de la pendiente b (Hipótesis nula:  $a = 0$ )

Varianza:

$$S^2_a = S^2_b \frac{\sum x^2}{n} = 290.0175$$

$$Sa = 17.03$$

$$Sa \text{ rel.(\%)} = \frac{Sa \times 100}{a} = 68.7799$$

### Límite de confianza:

$$a \pm t_{Sa} = 24.76 \pm 3.182 \times 17.03$$

$$a \pm t_{Sa} = 24.76 \pm 54.189 \quad (\text{Entre } 78.949 \text{ y } -29.429)$$

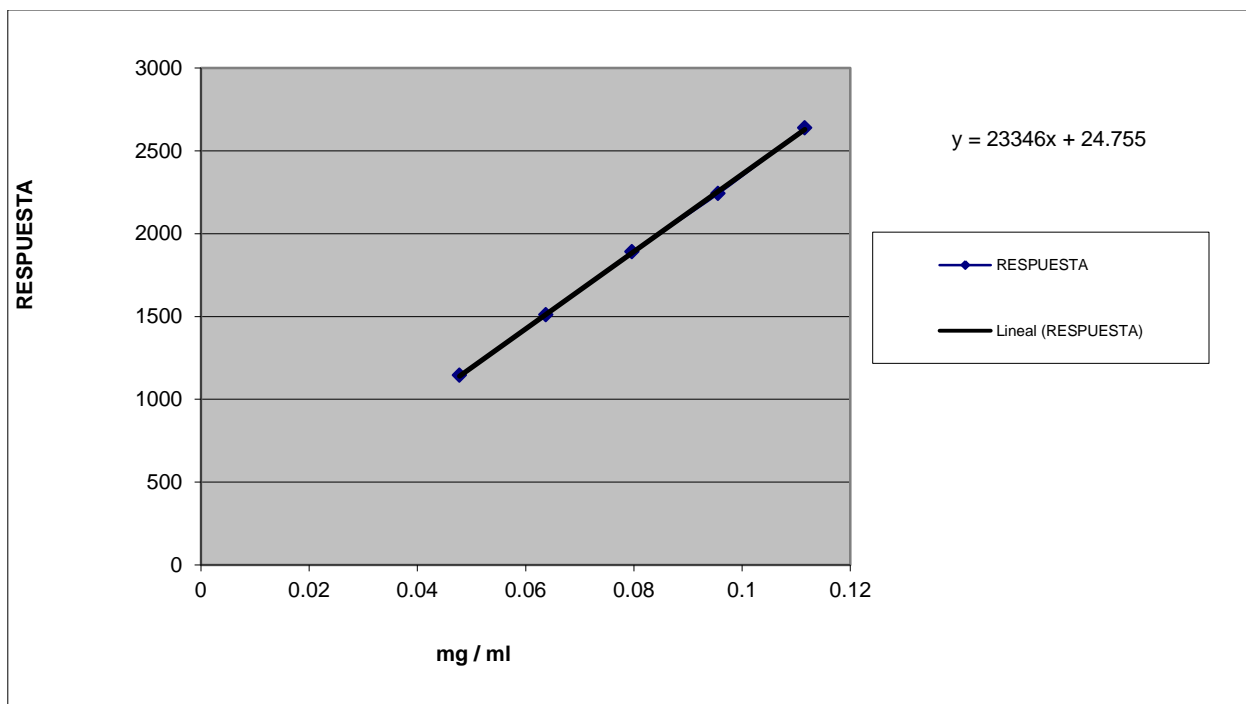
### Test de t:

$$T_{\text{exp}} = \frac{|a|}{Sa} = 1.454$$

$$T_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}}$$

Este valor indica que la probabilidad de ser  $a \neq 0$  es muy elevada, mayor al 99,9 %.

Si  $a = 0$ , significa que la recta pasa por el origen de las coordenadas.



**Figura N°2: Representación grafica de la linealidad de Sistema de Clorfenamina Maleato**

### 6.3. EXACTITUD

**Tabla N°10: Determinación de las muestras de Clorfenamina Maleato**

Concentración %	Peso	Área	S	S <sup>2</sup>
60.00%	24.04	1168.0728	0.14	0.019
	24.05	1171.1243		
	24.09	1173.6547		
100.00%	16.02	1935.7809	0.33	0.106
	16.05	1949.5342		
	16.00	1945.0330		
140.00%	22.48	2738.8419	0.04	0.001
	22.43	2731.4825		
	22.46	2736.7769		

#### Test de Igualdad de Varianzas (Test G de Cochran):

$$G_{\text{exp}} = \frac{S_{\text{max}}^2}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2} = \frac{0.106}{0.13} = 0.84$$

$$G_{\text{tabla}} (P=0,05; K=3; n=3) = 0.8709$$

Al ser  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$  significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes. Es decir, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

**Tabla N°11: Porcentaje de recuperación (Test t de Student)**

Concentración	Recuperación	Promedio	DSR
60.00%	99.72%	99.88%	0.14%
	99.93%		
	99.98%		
100.00%	99.19%	99.56%	0.33%
	99.71%		
	99.79%		
140.00%	100.04%	100.01%	0.04%
	99.97%		
	100.03%		
<b>PROMEDIO</b>		99.82	
<b>DS</b>		0.27	
<b>DSR</b>		0.27	

$$T_{\text{exp}} = \frac{100 - R / \sqrt{n}}{CV} = \frac{100 - 99.82 / \sqrt{9}}{0.27} = 2.040$$

$$T_{\text{tabla}} (P = 0.05; GL = 9-1 = 8) = 2.306$$

Al ser  $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100%, confirmando que el método es exacto.



## 6.4. PRECISIÓN

### 6.4.1 REPETIBILIDAD

Tabla N°12: Pesos y factores de los estándares y muestras:

	Pesos (mg)	Factores
<b>Estándar 1</b>	20.06	0.0800
<b>Estándar 2</b>	20.05	0.0800
<b>Muestra 1</b>	212.29	1253.4151
<b>Muestra 2</b>	212.21	1523.8877
<b>Muestra 3</b>	212.11	1254.4788
<b>Muestra 4</b>	212.10	1254.5380
<b>Muestra 5</b>	212.20	1253.9467
<b>Muestra 6</b>	212.07	1254.7154

Tabla N°13: Resultados de la Repetibilidad

	Concentración	%Recuperación	Promedio	DS	DSR
<b>Muestra 1</b>	<b>100.00%</b>	<b>97.78%</b>	<b>98.03%</b>	<b>1.00</b>	<b>1.01%</b>
<b>Muestra 2</b>		<b>97.53%</b>			
<b>Muestra 3</b>		<b>99.67%</b>			
<b>Muestra 4</b>		<b>98.51%</b>			
<b>Muestra 5</b>		<b>96.72%</b>			
<b>Muestra 6</b>		<b>97.99%</b>			

**Límite de Confianza Individual (95%):**  $x \pm ts$   $t = 2.57$  (P = 0.05)  
n = 6

**LC Ind. =** 98.03  $\pm$  2.57 x 1.00

**LC Ind. =** 98.03  $\pm$  2.57

**LC Ind. =** 95.46 - 100.60

**Límite de Confianza de la Media (95%):**  $x \pm ts/\sqrt{n}$   $t = 2.57$  (P = 0.05)  
n = 6

**LC Med. =** 98.03  $\pm$  2.57 x 1.00 / 2.45

**LC Med. =** 98.03  $\pm$  1.05

**LC Med. =** 96.98 - 99.08

#### 6.4.2 PRECISIÓN INTERMEDIA

Tabla N°14: Pesos y factores de los estándares y muestras:

	Pesos (mg)	Factores
<b>Estándar 1</b>	20.45	8.15546
<b>Estándar 2</b>	20.10	8.01588
<b>Muestra 1</b>	212.51	12.5212
<b>Muestra 2</b>	212.48	12.5229
<b>Muestra 3</b>	212.71	12.5094
<b>Muestra 4</b>	212.06	12.5477
<b>Muestra 5</b>	212.32	12.5324
<b>Muestra 6</b>	212.47	12.5235

Tabla N°15: Resultados de la Precisión Intermedia

	Concentración	%Recuperación	Promedio	DS	DSR
<b>Muestra 1</b>	<b>100.00%</b>	<b>95.29%</b>	<b>96.52%</b>	<b>1.03</b>	<b>1.07%</b>
<b>Muestra 2</b>		<b>98.14%</b>			
<b>Muestra 3</b>		<b>97.30%</b>			
<b>Muestra 4</b>		<b>96.16%</b>			
<b>Muestra 5</b>		<b>95.88%</b>			
<b>Muestra 6</b>		<b>96.34%</b>			

**Límite de Confianza Individual (95%):**  $x \pm ts$   $t = 2.57$  (P = 0.05)  
n = 6

**LC Ind. =** 96.52  $\pm$  2.57  $\times$  1.03

**LC Ind. =** 96.52  $\pm$  2.65

**LC Ind. =** 93.87 - 99.17

**Límite de Confianza de la Media (95%):**  $x \pm ts/\sqrt{n}$   $t = 2.57$  (P = 0.05)  
n = 6

**LC Med. =** 96.52  $\pm$  2.57  $\times$  1.03 / 2.45

**LC Med. =** 96.52  $\pm$  1.08

**LC Med. =** 95.44 - 97.60

## 6.5. ROBUSTEZ

**Tabla N°16: Pesos y factores de los estándares y muestras:**

	<b>Pesos (mg)</b>	<b>Factores</b>
<b>Estándar 1</b>	20.06	0.0800
<b>Estándar 2</b>	20.05	0.0800
<b>Muestra 1</b>	212.29	1253.4151
<b>Muestra 2</b>	212.21	1523.8877
<b>Muestra 3</b>	212.11	1254.4788
<b>Muestra 4</b>	212.10	1254.5380
<b>Muestra 5</b>	212.20	1253.9467
<b>Muestra 6</b>	212.07	1254.7154

**Tabla N°17: Resultados de la Robustez**

	<b>Concentración</b>	<b>%Recuperación</b>	<b>Promedio</b>	<b>DS</b>	<b>DSR</b>
<b>Muestra 1</b>	<b>100.00%</b>	<b>97.93%</b>	<b>97.94%</b>	<b>0.85</b>	<b>0.86%</b>
<b>Muestra 2</b>		<b>97.87%</b>			
<b>Muestra 3</b>		<b>99.44%</b>			
<b>Muestra 4</b>		<b>98.02%</b>			
<b>Muestra 5</b>		<b>96.89%</b>			
<b>Muestra 6</b>		<b>97.48%</b>			

**Límite de Confianza Individual (95%):**  $x \pm ts$   $t = 2.57$  (P = 0.05)  
 $n = 6$

**LC Ind. =** 97.94  $\pm$  2.57 x 0.85

**LC Ind. =** 97.94  $\pm$  2.18

**LC Ind. =** 95.76 - 100.12

**Límite de Confianza de la Media (95%):**  $x \pm ts/\sqrt{n}$   $t = 2.57$  (P = 0.05)  
 $n = 6$

**LC Med. =** 97.94  $\pm$  2.57 x 0.85 / 2.45

**LC Med. =** 97.94  $\pm$  0.09

**LC Med. =** 97.85 - 98.03

## 6.6. ESTABILIDAD

### 6.6.1 Estabilidad de Sistema:

Tabla N°18: Pesos y factores de los estándares:

	Pesos (mg)	Factores
Estándar 1-EST	20.09	0.0801
Estándar 2-EST	20.00	0.0798

Concentración	Tiempo Cero	Estabilidad	DS entre Estándares
100.00%	99.70%	99.50%	0.20%

### 6.6.2 Estabilidad de la Muestra:

Tabla N°19: Resultados de la Estabilidad de la Muestra:

	Concentración	%Recuperación	Promedio	DS	DSR
Muestra 1	100.00%	97.63%	97.84%	0.99	1.01%
Muestra 2		97.39%			
Muestra 3		99.44%			
Muestra 4		98.29%			
Muestra 5		96.47%			
Muestra 6		97.80%			

## VII. DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis desarrolla una técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para la cuantificación de Clorfenamina Maleato 4 mg Tableta, el cual no figura en ninguna obra oficial. Como se sabe éste tipo de análisis presenta mayores ventajas en relación a otros métodos como son los volumétricos y espectrofotométricos.

Para determinar las mejores condiciones cromatográficas se efectúa diferentes ensayos para proceder a la validación del método desarrollado.

### ESPECIFICIDAD

El método analítico nos permite obtener picos Cromatográficos de Clorfenamina Maleato con tiempos de retención similares, tanto para el estándar como para la muestra.

Tiempo de Retención del Estándar: 2.839

Tiempo de Retención del Placebo Cargado: 2.833

El análisis de placebo nos demuestra que ningún excipiente interfiere con los picos de los principios activos, como tampoco se ha detectado la presencia de productos de degradación de Clorfenamina Maleato. Se observa una disminución de principio activo en el estándar oxidativa, sin embargo no se observa interferencia

### LINEALIDAD

La linealidad de sistema de Clorfenamina Maleato se realiza a las siguientes concentraciones: 60%, 80%, 100%, 120% y 140% (siendo el 100% igual a 0.08 mg/mL) las cuales al ser evaluadas estadísticamente, se observa que para el rango entre 60% y 140% se obtiene un coeficiente de correlación  $r = 0,99993$  a partir de la ecuación de la recta (concentración vs áreas):

$$y = 24579x + 14,47$$

Se obtiene un coeficiente de determinación  $r^2 = 0,99957$  siendo el valor mínimo permisible de 0,997.

Queda establecido que la pendiente de la recta de regresión (24579) es significativamente diferente de cero, mediante la aplicación del test de hipótesis para la pendiente, donde la  $t_{\text{exp}}$  (82.521) es mayor a la  $t_{\text{tabla}}$  (3.182) para (n-2) grados de libertad y un nivel de significación de 95%. El intervalo de confianza para la pendiente es: (25526.759 y 23631.241). **Ver pág. N°62**

Al ser  $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$  significa que la probabilidad de ser  $b \neq 0$  es muy elevada, incluso superior al 99,9%. Si fuera  $b = 0$  significaría que la recta es paralela al eje de las abscisas y no hay regresión.

La proporcionalidad entre la concentración de analito y las áreas obtenidas, se demuestra mediante la aplicación de los test de hipótesis para el intercepto de la recta (14.47). El  $t_{\text{exp}}$  (0.271) es menor al  $t_{\text{tabla}}$  (3.182), para (n-2) grados de libertad y un nivel de significación del 95%; por lo tanto, el intercepto de la recta no es significativamente diferente de cero. El intervalo de confianza para el intercepto es: (184.262 y -155.322). **Ver pág. N°62**

La linealidad de método de Clorfenamina Maleato se realiza a las siguientes concentraciones: 60%, 80%, 100%, 120% y 140% (siendo el 100% igual a 0.08 mg/mL) las cuales al ser evaluadas estadísticamente, se observa que para el rango entre 60% y 140% se obtiene un coeficiente de correlación  $r = 0,99994$  a partir de la ecuación de la recta (concentración vs áreas):

$$y = 23346x + 24.76$$

Se obtiene un coeficiente de determinación  $r^2 = 0,99977$  siendo el valor mínimo permisible de 0,997.

Queda establecido que la pendiente de la recta de regresión (23346) es significativamente diferente de cero, mediante la aplicación del test de hipótesis para la pendiente, donde la  $t_{\text{exp}}$  (113.55) es mayor a la  $t_{\text{tabla}}$  (3.182) para (n-2) grados de libertad y un nivel de significación de 95%. El intervalo de confianza para la pendiente es: (24000.25 y 22691.75). **Ver pág. N°66**

Al ser  $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$  significa que la probabilidad de ser  $b \neq 0$  es muy elevada, incluso superior al 99,9%. Si fuera  $b = 0$  significaría que la recta es paralela al eje de las abscisas y no hay regresión.

La proporcionalidad entre la concentración de analito y las áreas obtenidas se demuestra mediante la aplicación de los test de hipótesis para el intercepto de la recta (24.76). El  $t_{exp}$  (1.454) es menor al  $t_{tabla}$  (3.182), para (n-2) grados de libertad y un nivel de significación del 95%, por lo tanto, el intercepto de la recta no es significativamente diferente de cero. El intervalo de confianza para el intercepto es: (78.949 y -29.429). **Ver pág. N°67**

## EXACTITUD

Se evalúa el porcentaje de recuperación. De la tabla N°10, al aplicar el test de igualdad de varianzas (test G de Cochran) para determinar si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados, se obtiene un valor  $G_{exp} = 0.84$  vs  $G_{tabla}$  (0.05, 3, 3) = 0.8709.

Donde k = número de grupos y n = número de determinaciones por grupo.

Al ser  $G_{exp} < G_{tabla}$  significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes. Es decir el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Asimismo, el porcentaje de recuperación que se obtiene es satisfactorio (media = 99.82%), para confirmar se aplica el test de Student cuyos resultados son  $t_{exp} = 2.040$  vs  $t_{tabla} = 2.306$ .

Al ser  $t_{exp} < t_{tabla}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100 confirmándose que el método es exacto.

## PRECISIÓN

### Repetibilidad:

El estudio de repetibilidad se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea por el mismo instrumento (Agilent DAD-2 1200) y el mismo analista, obteniéndose los siguientes resultados de la tabla N°13.

Coeficiente de variación (CV) = 1.00

Límite de confianza individual (95%):  $\bar{x} \pm t_s$

Los límites de confianza de los resultados individuales indican que el 95% del principio activo estuvieron entre:

LC individual = 95.46% - 100.60%

Límite de confianza de la media (95%):  $x \pm ts / \sqrt{n}$

Los límites de confianza de la media indican que el contenido medio del principio activo en el producto terminado se encuentra con una probabilidad del 95% entre:

LC media = 96.98% - 99.08%

### **Precisión Intermedia:**

Para el estudio de la precisión intermedia se evalúa los efectos causados al variar una serie de factores. Típicos factores que se estudian son el día, el analista (Diana Mendoza) y el equipo (Merck Hitachi LaChrom Elite). Obteniéndose los siguientes resultados de la tabla N°15.

Coeficiente de variación (CV) = 1.03

Límite de confianza individual (95%):  $x \pm ts = 93.87\% - 99.17\%$

Límite de confianza de la media (95%) =  $x \pm ts / \sqrt{n} = 95.44\% - 97.60\%$

Los límites de confianza de los resultados individuales indican que el 95% de los resultados están entre 93.87% - 99.17%

Los límites de confianza de la media indican que el contenido medio del principio activo del producto terminado se encuentra con una probabilidad del 95% entre 95.44% - 97.60%.

### **ROBUSTEZ**

Se obtiene resultados que no varían significativamente con membrana de Poliamida a condiciones normales, obteniéndose una desviación estándar de 0.85.

### **RANGO**

Para el principio activo Clorfenamina Maleato, el rango de concentraciones de 60% a 140% es preciso, exacto y lineal.

### **ESTABILIDAD**

Los estándares y las muestras se mantienen estables dentro de un periodo de 24 horas siendo la desviación relativa entre los estándares es de 0.20% y la diferencia relativa entre las muestras es de 0.20%.



## VIII. CONCLUSIONES

- El nuevo método analítico para la cuantificación de Clorfenamina Maleato 4 mg Tabletas por Cromatografía Líquida de Alta Performance (H.P.L.C.) propuesto, cumple con las exigencias en todos los parámetros de la validación por lo cual produce resultados proporcionales a la concentración del analito en la muestra, demostrando su confiabilidad, garantizando la calidad, eficacia e inocuidad del medicamento.
- Se verificó el cumplimiento de los parámetros de aceptabilidad.
- El método desarrollado es específico; ya que no se detectó interferencia con la matriz, ni con los productos de degradación.
- El método es lineal en el intervalo de concentración de 60% hasta 140% de sistema y muestra, siendo el 100% igual a 0.08 mg/mL de Clorfenamina Maleato.
- El método es exacto, ya que su capacidad analítica de dar resultados lo más cercano al valor real queda demostrado al no haber diferencia significativa entre la recuperación media de 99.82% y el 100%.
- El método es preciso, ya que el grado de concordancia que existe entre las pruebas, nos permite obtener resultados repetitivos.
- El método es robusto para el cambio de membrana utilizada, ya que no hay diferencia significativa con los resultados obtenidos trabajando a las condiciones cromatografías establecidas.
- El método es estable, ya que dentro del periodo de 24 horas no hay diferencia significativa en los resultados obtenidos.
- Se validó y desarrolló un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), cumple con los requerimientos y normas ICH y Farmacopea Estadounidense (USP), estableciéndose un protocolo utilizado en industria farmacéutica para la cuantificación del principio activo.

## **IX. RECOMENDACIONES**

- La validación de métodos analíticos es una de las medidas universalmente reconocidas como parte necesaria de todo sistema completo de Garantía de Calidad en química analítica y es un componente esencial, por lo cual debe ser implementado para producir datos analíticos fiables.
- Se recomienda el uso de este formato, el cual contempla de forma detallada su desarrollo, como lo establecen las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio, desde el establecimiento de objetivos, hasta la elaboración del informe técnico, el mismo que presenta en forma concisa los resultados.
- Antes de iniciar el análisis cuantitativo de los compuestos realizar los cálculos respectivos de la cantidad de fase móvil necesaria para el análisis y las diluciones.
- Utilizar en todo el análisis del ensayo septas en los viales de los estándares y muestras, de la misma clase para evitar la evaporación de los solventes y que existan variaciones por problemas con la inyección de las muestras al no ser perforadas por la jeringa de la manera adecuada.
- Establecer la técnica correcta de emplear las pipetas volumétricas al liberar el solvente, es decir sin soplar ni dar golpes.
- La utilización del método de análisis para la Clorfenamina Maleato 4 mg Tabletas debe estar acorde a la Técnica Analítica desarrollada y al Protocolo de Validación emitido, cualquier modificación en el método analítico significa una revalidación de dicho proceso.

## **X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Alonso J, Blanco J, Bustamante P. Tecnología farmacéutica. Madrid. Editorial síntesis. Vol 2: Formas farmacéuticas; 1997
2. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura (Sede web) Ministerio de salud, Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas - DIGEMID; [base de datos en línea]. Perú: Portal de DIGEMID; 1999. [acceso 10 de febrero del 2014]. URL disponible en: <http://www.digemid.minsa.gob.pe>
3. Skoog D., West D., Química analítica. Capítulo 18 “Métodos Cromatográficos” México: Mc GRAW – HILL, 4ta Edición; 1994.
4. Frederick M. Principios de garantía de calidad para laboratorios analíticos. Madrid: Edición española; 1991.
5. Faulli I. Tratado de Farmacia Galénica; Validación de Procesos y Analítica de Medicamentos. Madrid; 1996.
6. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A.E.F.I.). Validación de Métodos Analíticos. Barcelona, Marzo 2001.
7. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A.E.F.I.). Validación de Métodos Analíticos, Comisión de Normas de la Correcta Fabricación y Control de Calidad, Sección Catalana, España, 2001.
8. Castillo, B. Protocolo de Validación de Métodos analíticos para la Cuantificación de Fármacos. Revista Cubana de Farmacia [en línea]. 1996. [4 de febrero del 2014]; No. 30 URL disponible en: <http://www.sld.cu>. Acceso: Junio 2014.
9. The Merck Index; Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Tenth Edition. Baltimore. 1983.
10. Castro M, Gaston S, Pujol M. Validación de métodos analíticos. (A.E.F.I.) Sección catalana; Madrid, 1999.
11. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional. USP 36 – NF 31. Convención Farmacopeica de los Estados Unidos. Estados Unidos de América. 2013; 31th edición. Capítulo general <1225>, Pag. 1093-1098.

12. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Guía de Protocolos de Validación de Procesos no estériles, Comisión de Normas de Correcta Fabricación y Control de Calidad, Sección Centro, España, 2001.
13. Quattrocchi O., Abelaira de Andrizzi S., Laba E. Introducción al HPLC. Aplicación y Práctica. Buenos Aires: Editorial Universitaria de Buenos Aires; 1992.
14. Walden University. [en línea] Validación de Métodos Analíticos [acceso 20 de marzo del 2014] URL disponible en <http://www.genium.udistrital.edu.com>.
15. Skoog D, Leary LJ. Análisis Instrumental, 4ta ed. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana España S.A; 1994.
16. Bender G., Métodos Instrumentales en Química Clínica, 1a ed. Saragoza: Editorial Acribia S.A.; 1992.
17. Barcelli V. Curso de Entrenamiento de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC); Lacrom Merck. Lima. 2002.
18. Del Castillo, B. Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud 4ª edición. Barcelona: Piro; 1998.
19. Skoog D. Análisis Instrumental. Madrid: Mc Graw - Hill/ Interamericana 4ª edición; 1994.
20. Voight R. Tratado de tecnología Farmacéutica. Zaragoza: Acribia; 1982.
21. Teva Perú S.A. Política de validación de metodologías analíticas, Lima - Perú. Sede San Miguel, 1ª versión. 2014.
22. Medina Julca J; Berrocal Quinto J. Validación de método analítico de valoración de Naproxeno sódico 550 mg. tableta por cromatografía líquida de alta performance. [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Lima - Perú: Departamento académico de química básica y aplicada, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.
23. Agilent Technologies. Use manual Agilent 1200 Infinity Series Diode Array Detectors. [diapositiva]. Germany: Agilent Technologies Hewlett-Packard-Strasse; 2013. 276 diapositivas.
24. Agilent Technologies. Guía de selección de columnas para HPLC Agilent. [diapositiva]. Alemania: Agilent Technologies; 2009. 136 diapositivas.

25. Guidance for Industry-Analytical Procedures and methods validation for drugs and biologics [en línea]. U.S. department of health and human services, food and drug administration: CMC; 2014. [fecha de acceso 11 de noviembre de 2014]. URL disponible en:  
<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>
26. Guideline for industry – text on validation of analytical procedures [en línea]. ICH Q2A; 1995 [fecha de acceso 11 de noviembre de 2014]. URL disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm073381.pdf>
27. Who expert committee on specifications for pharmaceutical preparations [en línea]. TRS 981: forty-seventh report; 2013. [fecha de acceso 11 de noviembre de 2014]. URL disponible en:  
[http://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/quality\\_assurance/expert\\_committee/TRS981.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/expert_committee/TRS981.pdf)

## **XI. ANEXOS**

### **CONTENIDO:**

**ANEXO 1:** Fórmula con la que se desarrollo la Validación del Método Analítico.

- Tabla N°20: Fórmula de la Clorfenamina Maleato 4 mg Tableta

**ANEXO 2:** Cromatogramas obtenidos en la Validación.

- Figura N°3: Cromatograma del Estándar 1
- Figura N°4: Cromatograma del Estándar 2
- Figura N°5: Ensayo de Especificidad:
- Figura N°6: Estándar de Clorfenamina Maleato
- Figura N°7: Estándar de Clorfenamina Maleato especificidad
- Figura N°8: Placebo Cargado de Clorfenamina Maleato Tabletas
- Figura N°9: Placebo Cargado de Clorfenamina Maleato especificidad
- Figura N°10: Placebo de Clorfenamina Maleato Tabletas
- Figura N°11: Placebo de Clorfenamina Maleato especificidad
- Figura N°12: Isoplot: Estándar de Clorfenamina Maleato
- Figura N°13: Isoplot: Placebo Cargado de Clorfenamina Maleato 4 mg Tabletas
- Figura N°14: Isoplot: Placebo de Clorfenamina Maleato 4 mg Tabletas
- Figura N°15: Cromatograma del Placebo
- Figura N°16: Cromatograma del Placebo Cargado
- Figura N°17: Cromatograma del Estándar
- Figura N°18: Cromatograma de la Exactitud
- Figura N°19: Cromatograma de la Linealidad de Sistema
- Figura N°20: Resultados de la Linealidad de Sistema
- Figura N°21: Cromatograma de la Linealidad de Método
- Figura N°22: Resultados de la Linealidad de Método

- Figura N°23: Cromatograma de la Repetibilidad
- Figura N°24: Cromatograma de la Precisión Intermedia
- Figura N°25: Cromatograma de la Robustez
- Figura N°26: Cromatograma de la Estabilidad de Sistema
- Figura N°27: Cromatograma de la Estabilidad de la Muestra

## **ANEXO 1: FÓRMULA CON LA QUE SE DESARROLLO LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

**PRODUCTO:** Clorfenamina Maleato 4 mg

**FORMA FARMACÉUTICA:** Tabletas

**LOTE ESTÁNDAR:**

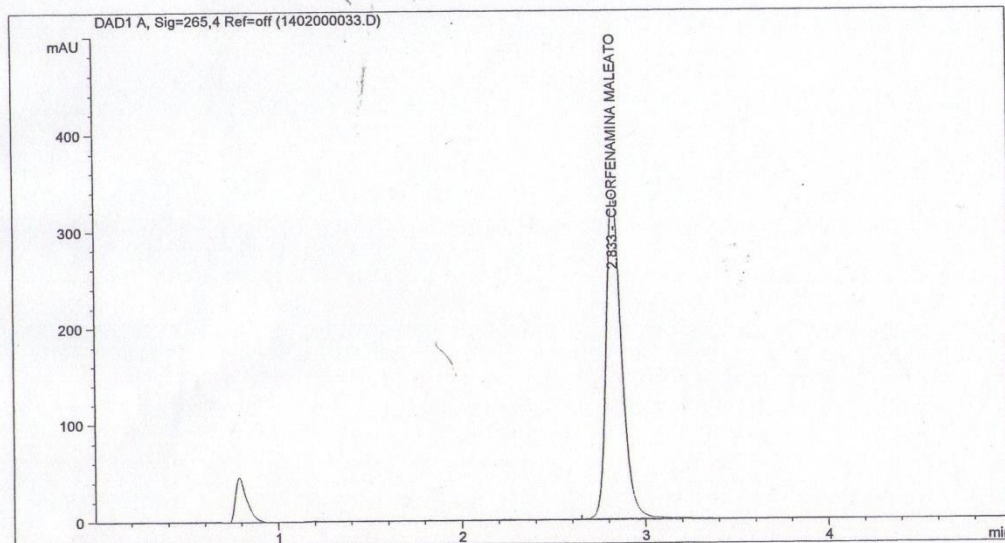
**Tabla N°20: Fórmula de la Clorfenamina Maleato 4 mg Tableta**

<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>LOTE ESTANDAR</b>	
	<b>CANTIDAD</b>	<b>UNIDAD</b>
Magnesio Estearato USP	0.00472	Kg
Lactosa Monohidratada USP	0.36860	Kg
Gelatina USP Polvo	0.01346	Kg
Celulosa Microcristalina (tipo 101)	0.03530	Kg
Almidón de Maíz	0.06839	Kg
Cantidad Total	0.500	Kg

Data File C:\CHEM32\...\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220 2014-02-20 18-10-32\1402000033.D  
Sample Name: ST-1

```
=====
Acq. Operator   : G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO      Seq. Line :   31
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD-3/HPLC09       Location  : Vial 51
Injection Date  : 20/02/2014 10:33:16 p.m.     Inj       :    1
                                           Inj Volume: 40 µl

Sequence File   : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                  2014-02-20 18-10-32\CLORF140220.S
Acq. Method     : C:\Chem32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                  2014-02-20 18-10-32\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 20/02/2014 10:33:05 p.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                  2014-02-20 18-10-32\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 24/02/2014 09:44:55 a.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
                  (recalibrated in sequence after loading)
Method Info     : DISOLUCION Y RESISTENCIA DE OMEPRAZOL CAPSULAS
=====
```



=====  
Calibration Table (after recalibration)  
=====

Calib. Data Modified : Monday, 24 Feb 2014 09:44:55 a.m.

Level 1 calibrated: Replace Response Factors,  
Replace Retention Times

Signal 1: DAD1 A, Sig=265,4 Ref=off

RetTime [min]	Lvl	Amount	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
2.833	1	7.98000e-2	1953.44214	4.08510e-5	CLORFENAMINA MALEATO
	1	8.01000e-2	1971.90955	4.06205e-5	

Rel. Reference Window : 5.000 %  
Abs. Reference Window : 1.000 min

HPLC 1200 DAD-3/HPLC09 24/02/2014 09:46:59 a.m. G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO Page 9 of 33

## ANEXO 2: CROMATOGRAMAS OBTENIDOS EN LA VALIDACIÓN

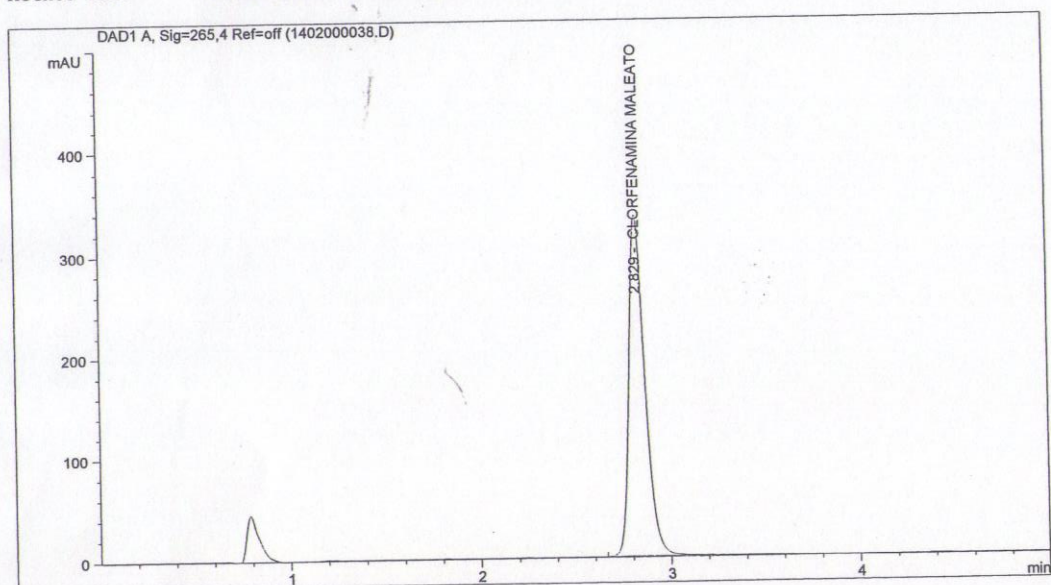
Figura N°3: Cromatograma del Estándar 1



Data File C:\CHEM32\...\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220 2014-02-20 10-32\1402000038.D  
Sample Name: ST-2

```
=====
Acq. Operator   : G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO      Seq. Line :   36
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD-3/HPLC09       Location  : Vial 52
Injection Date  : 20/02/2014 11:03:31 p.m.     Inj       :    1
                                           Inj Volume: 40 µl

Sequence File   : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                : 2014-02-20 18-10-32\CLORF140220.S
Acq. Method     : C:\Chem32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                : 2014-02-20 18-10-32\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 20/02/2014 11:03:20 p.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
                : (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                : 2014-02-20 18-10-32\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 24/02/2014 09:45:08 a.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
                : (recalibrated in sequence after loading)
Method Info     : DISOLUCION Y RESISTENCIA DE OMEPRAZOL CAPSULAS
=====
```



=====  
Calibration Table (after recalibration)  
=====

Calib. Data Modified : Monday, 24 February 2014 09:45:08 a.m.

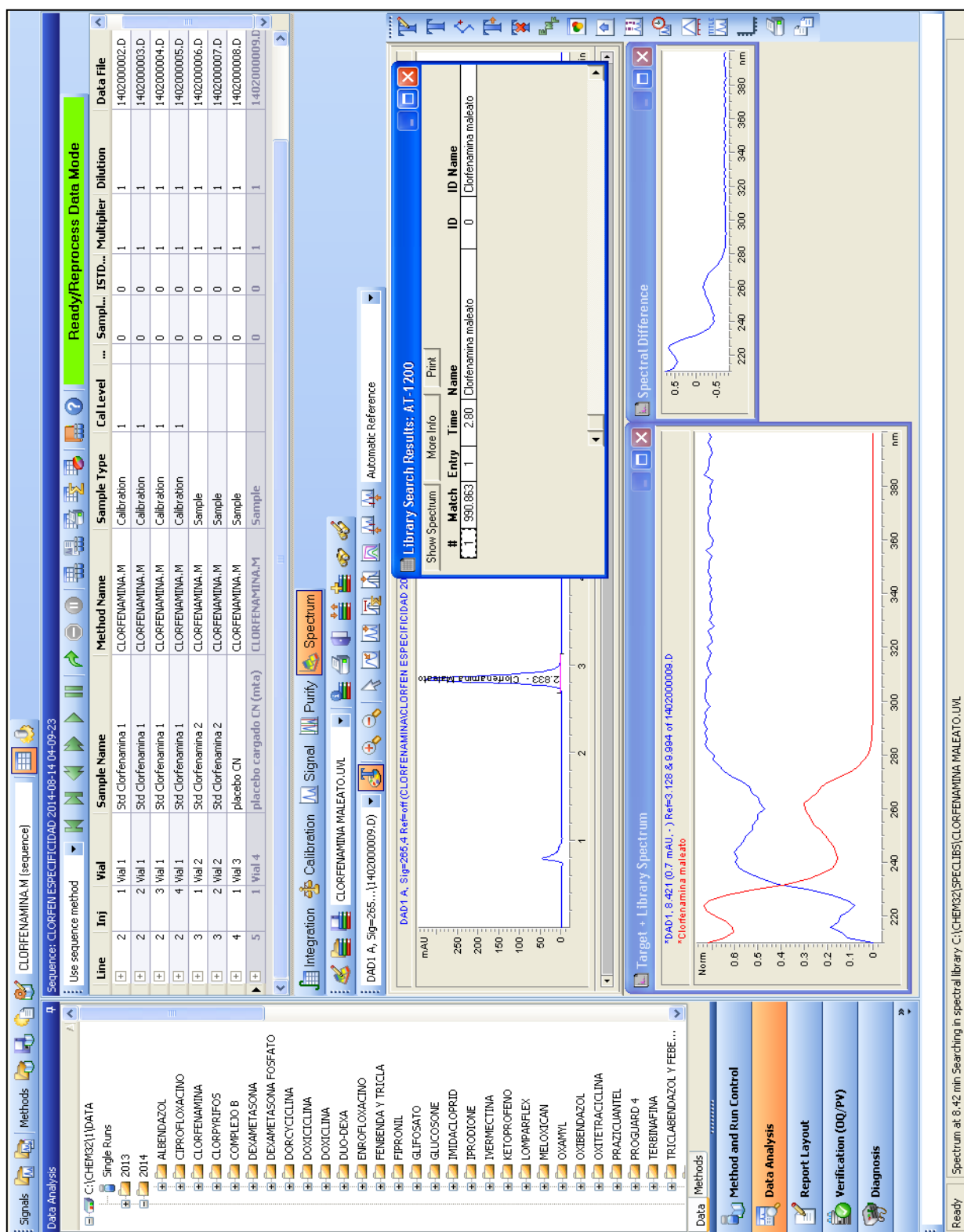
Level 2 calibrated: Replace Response Factors,  
Replace Retention Times

Signal 1: DAD1 A, Sig=265,4 Ref=off

RetTime [min]	Lvl	Amount	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
2.829	1	2.798000e-2	1953.44214	4.08510e-5	CLORFENAMINA MALEATO
	1	8.01000e-2	1970.42886	4.06510e-5	

Rel. Reference Window : 5.000 %  
Abs. Reference Window : 1.000 min

**Figura N°4: Cromatograma del Estándar 2**



**Figura N°5: Ensayo de Especificidad: Pureza de pico: Clorfenamina Maleato**

Data File C:\CHEM32\...\CLORFENAMINA\CLORFEN ESPECIFICIDAD 2014-08-14 04-09-23\1402000009.D  
Sample Name: PC CN

Search result of : DAD1, 8.421 (0.7 mAU, - ) Ref-3.128 & 9.994  
Library used : C:\CHEM32\SPECLIBS\CLORFENAMINA MALEATO.UVL  
Library Name :  
Parameters : None

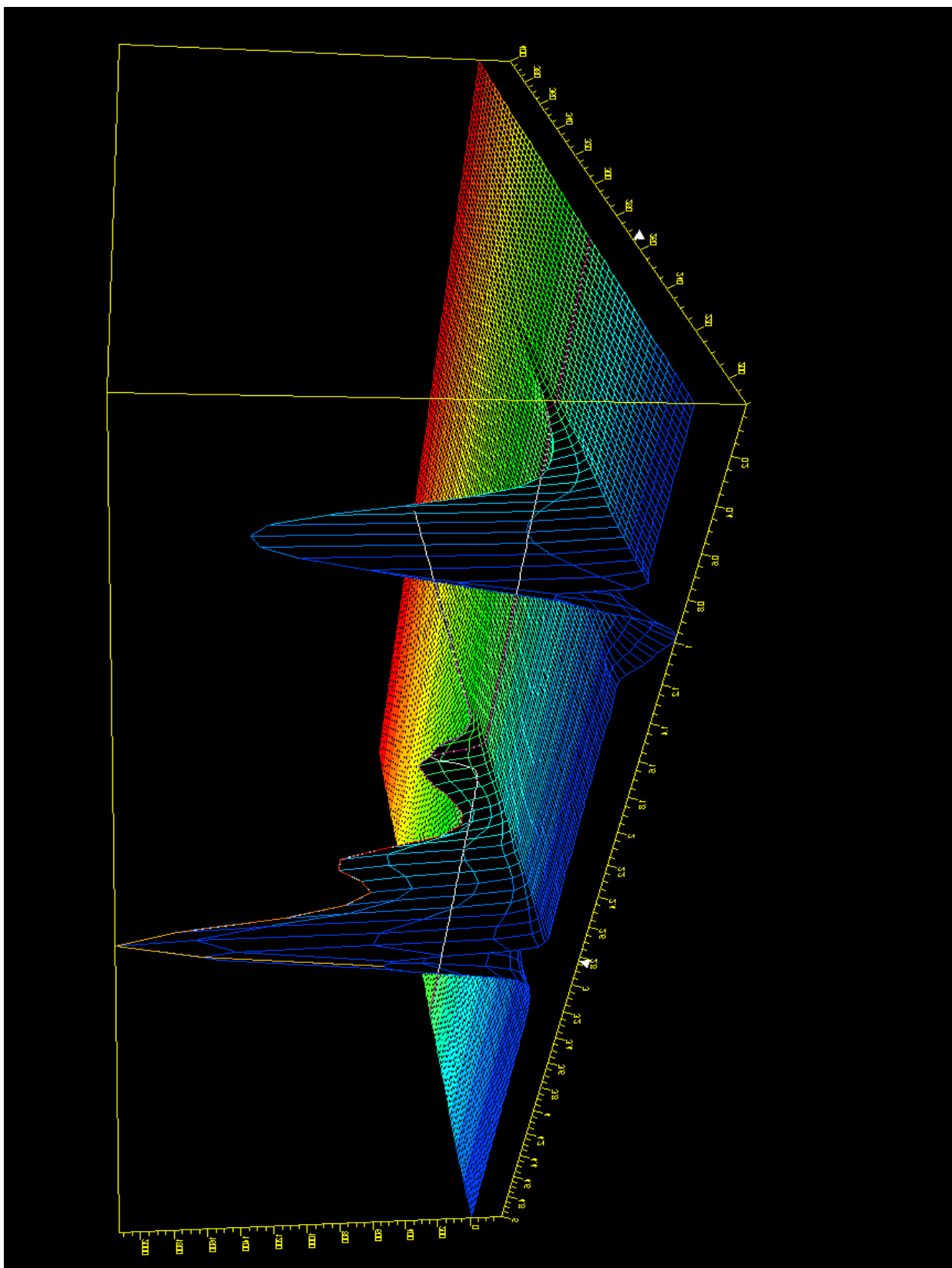
---

Library search results

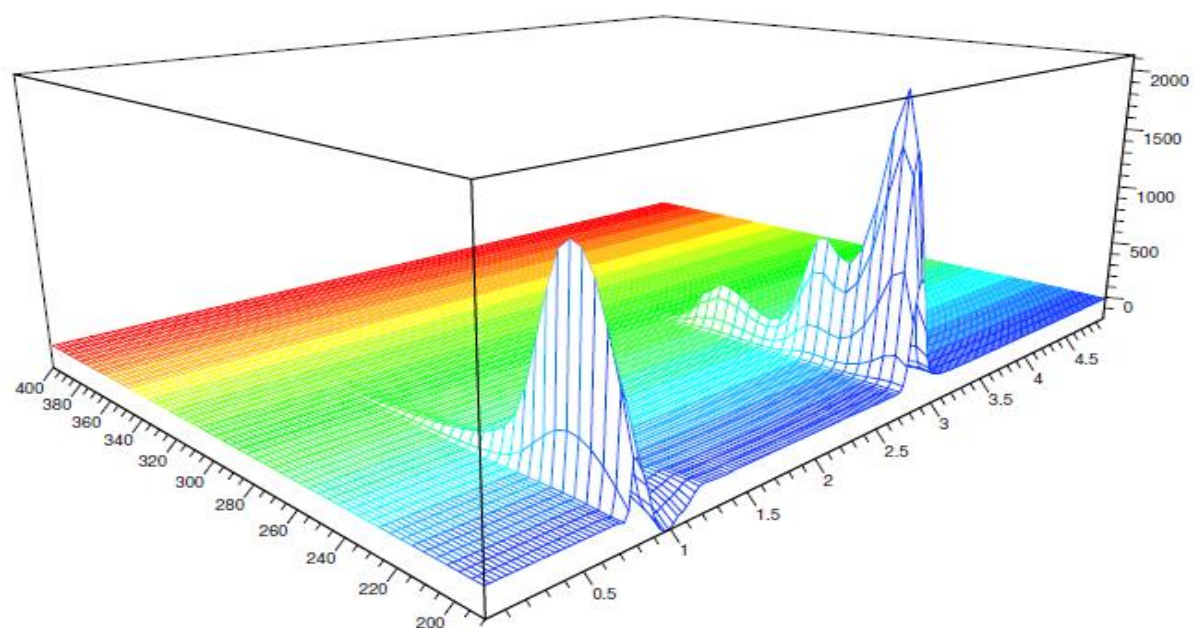
#	Match	Entry	Time [min]	Name
1	990.8627	1	2.802	Clorfenamina maleato

---

\*\*\* End of Report \*\*\*

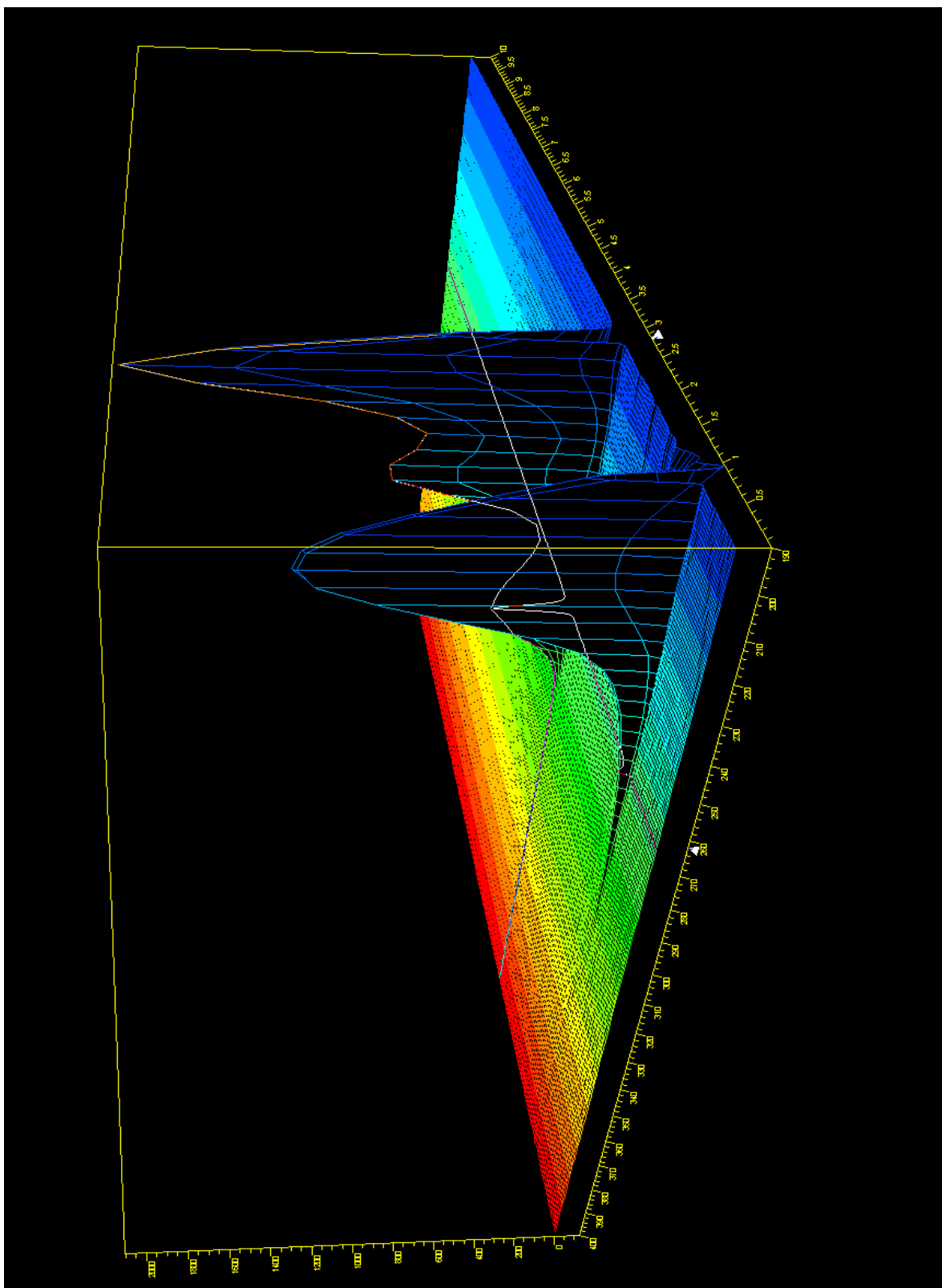


**Figura N°6: Estándar de Clorfenamina Maleato**



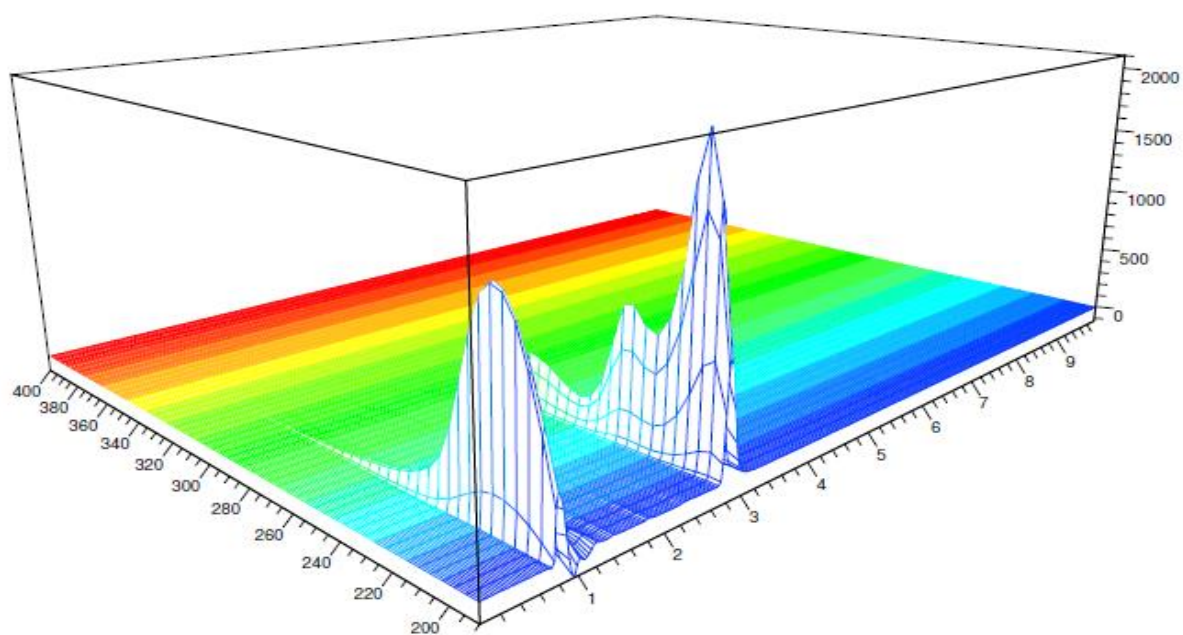
Datafile: C:\CHEM32\1\DATA\2014\CLORFENAMINA\CLORFEN ESPECIFICIDAD 201 Sample name: ST-1  
Tilt: 15.0 °, Swivel: 45.0 °  
Ranges: 0.0 to 5.0 min, 190.0 to 400.0 nm, -198.1 to 2124.5 mAU

**Figura N°7: Estándar de Clorfenamina Maleato especificidad**



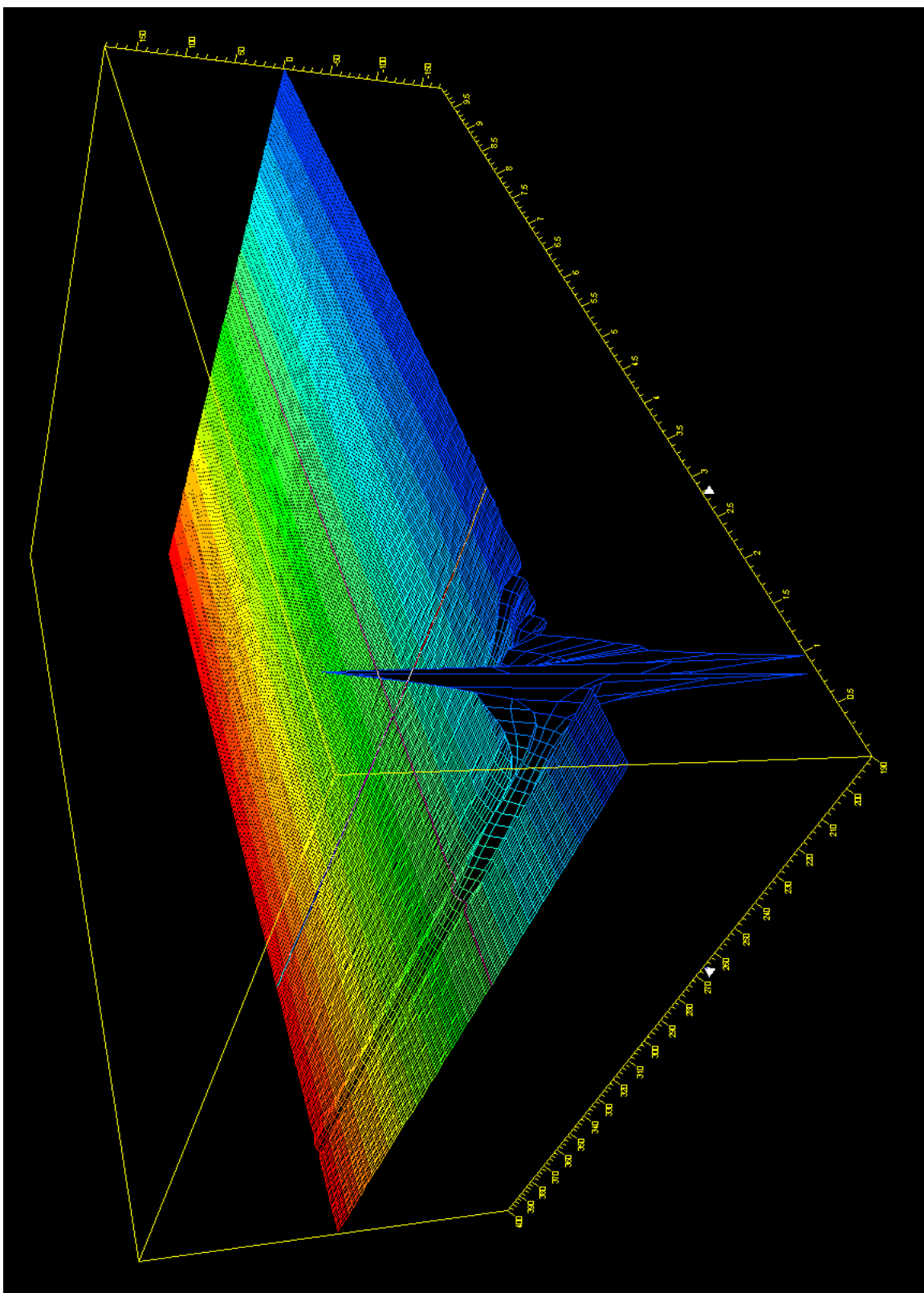
**Figura N°8: Placebo Cargado de Clorfenamina Maleato Tabletas**





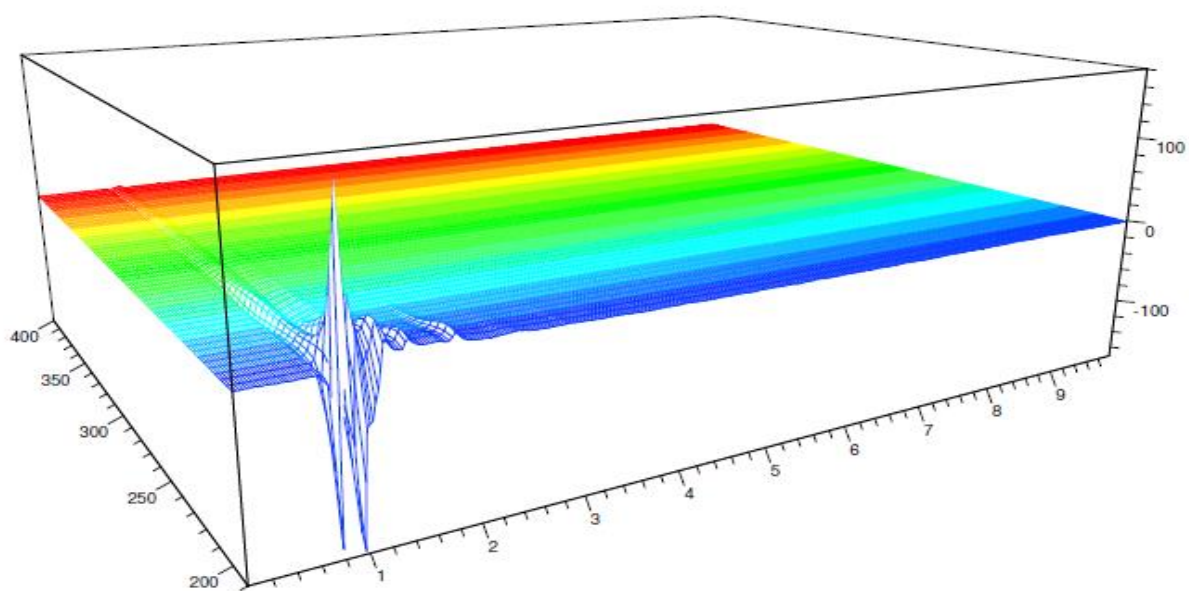
Datafile: C:\CHEM32\1\DATA\2014\CLORFENAMINA\CLORFEN ESPECIFICIDAD 201 Sample name: PC CN  
Tilt: 15.0 °, Swivel: 45.0 °  
Ranges: 0.0 to 10.0 min, 190.0 to 400.0 nm, -127.3 to 2101.8 mAU

**Figura N°9: Placebo Cargado de Clorfenamina Maleato especificidad**



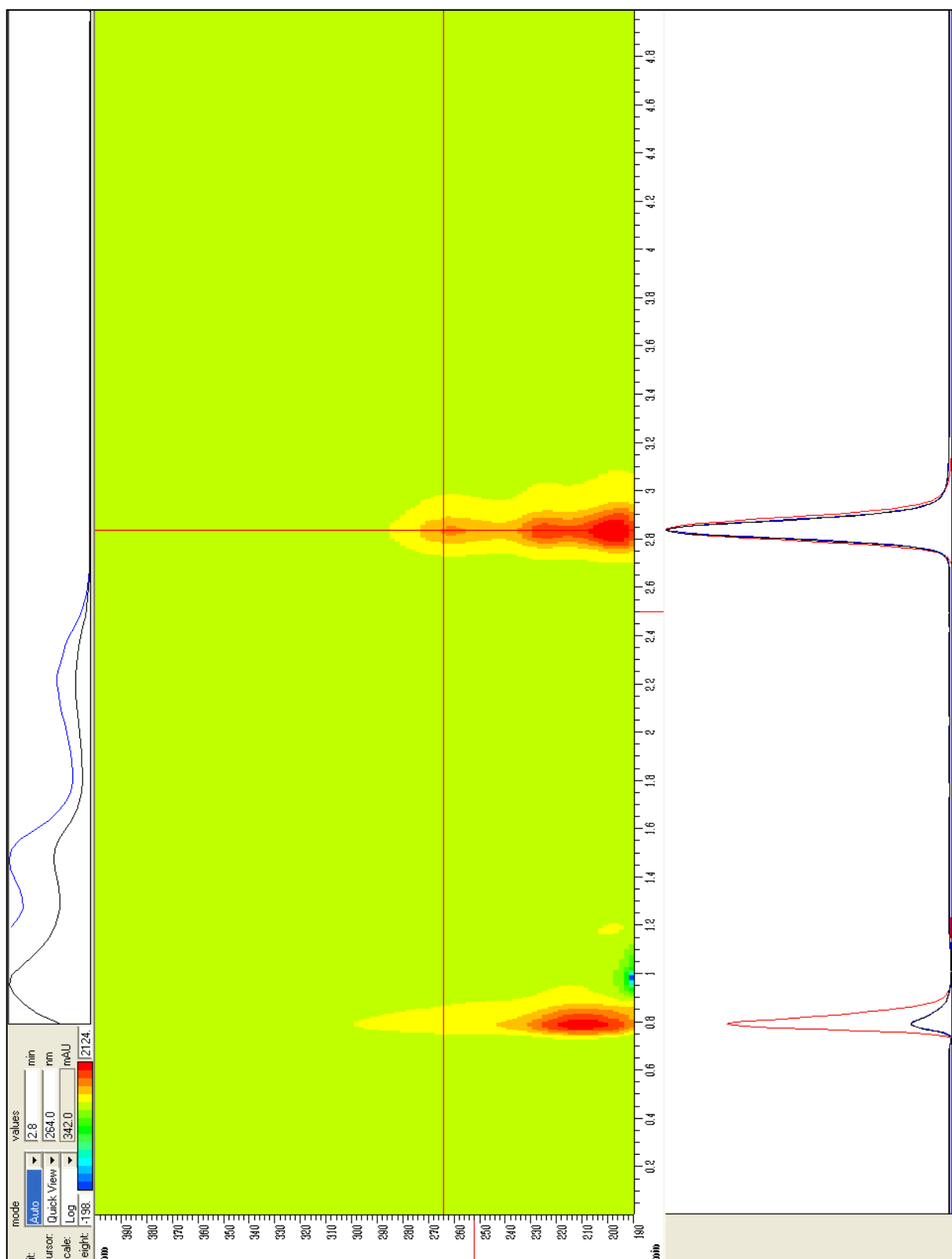
**Figura N°10: Placebo Clorfenamina Maleato Tablet**



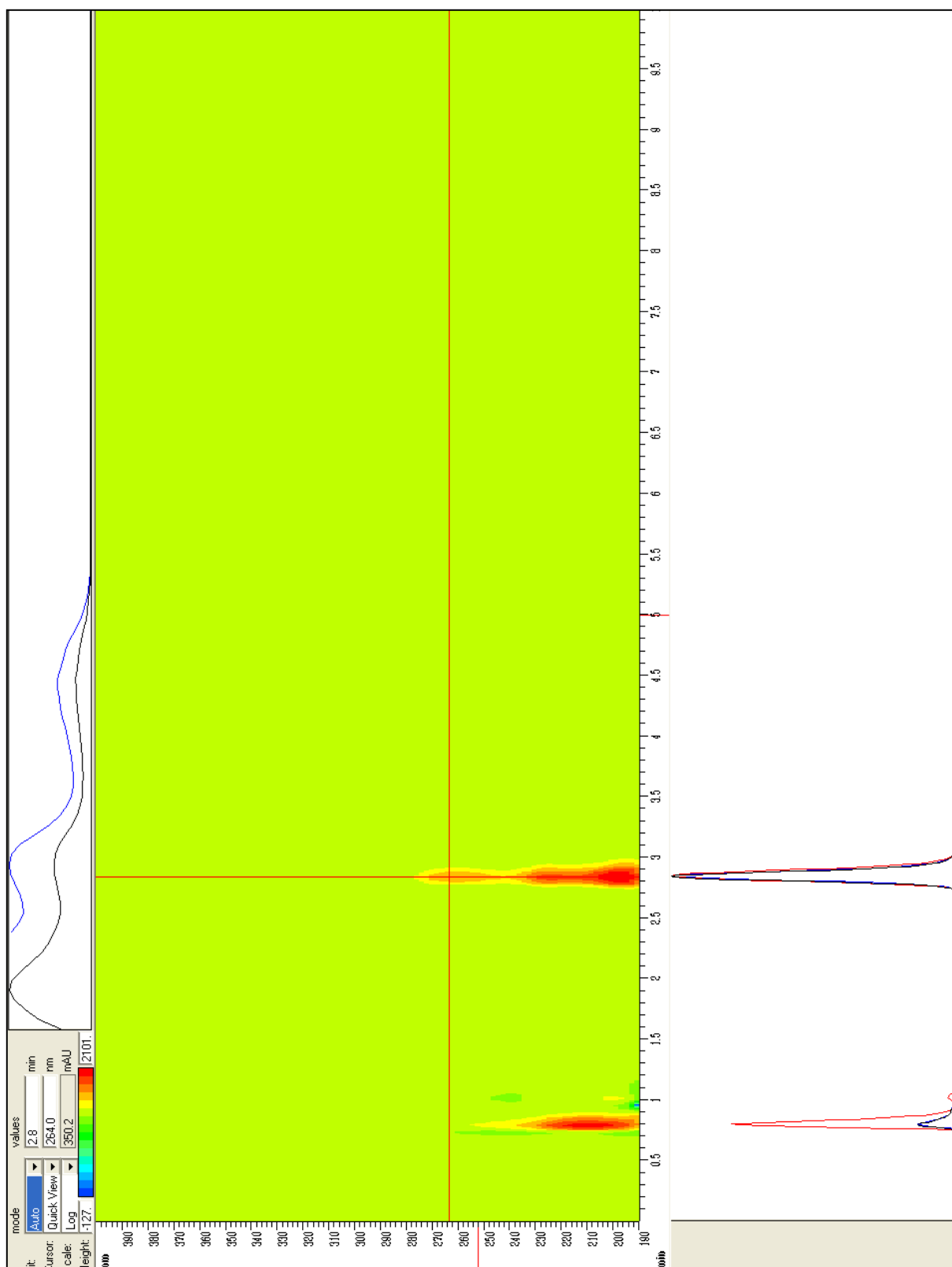


Datafile: C:\CHEM32\1\DATA\2014\CLORFENAMINA\CLORFEN ESPECIFICIDAD 201 Sample name: PB CN  
Tilt: 15.0 °, Swivel: 31.0 °  
Ranges: 0.0 to 10.0 min, 190.0 to 400.0 nm, -171.4 to 180.7 mAU

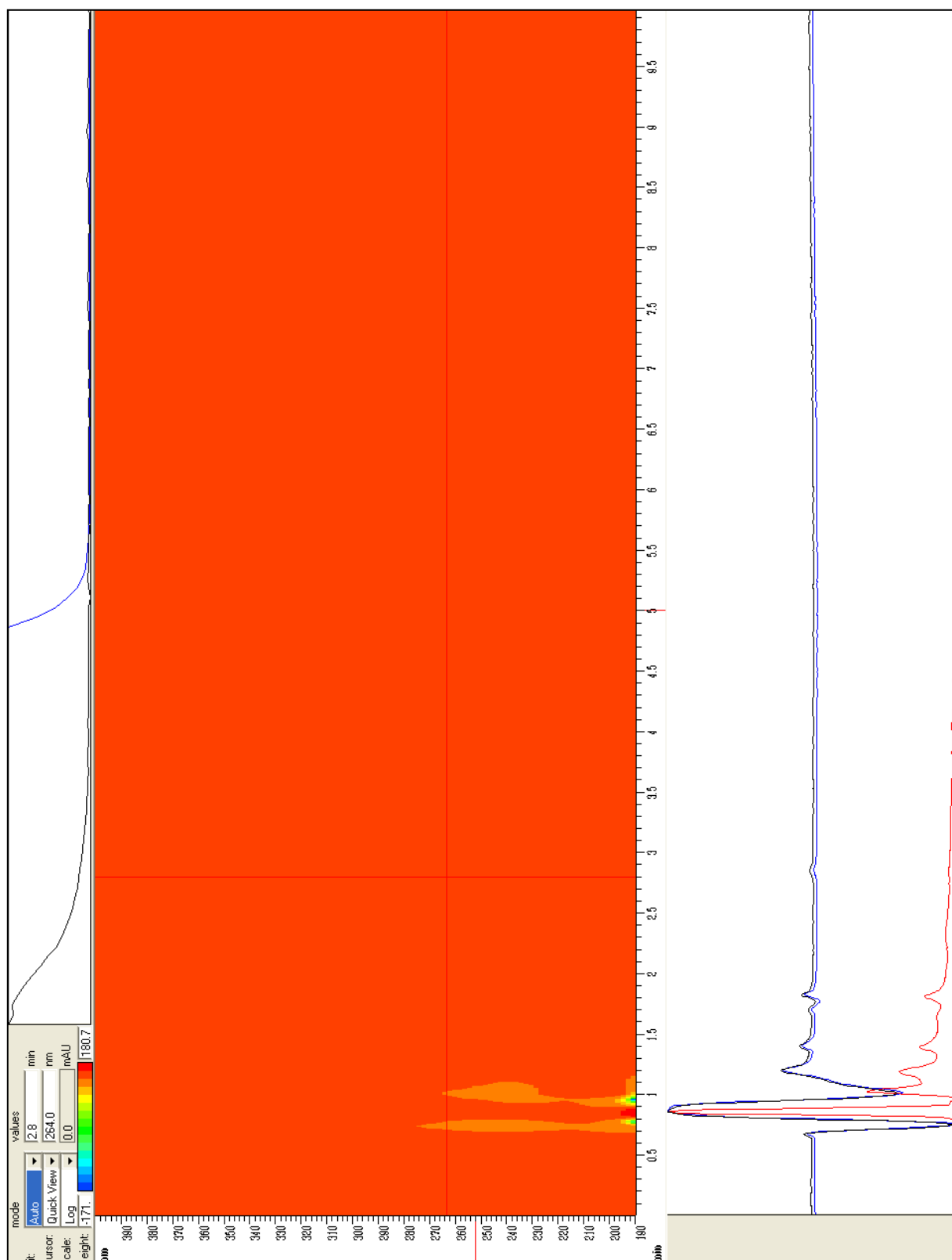
**Figura N°11: Placebo Clorfenamina Maleato especificidad**



**Figura N°12: Isoplot: Estándar de Clorfenamina Maleato**



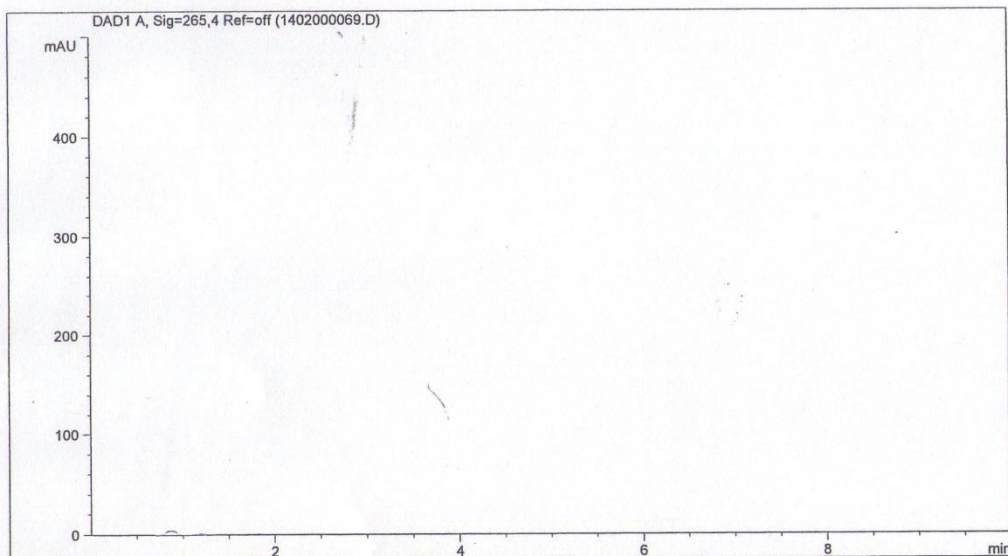
**Figura N°13: Isoplot: Placebo Cargado Clorfenamina Maleato 4 mg Tabletas**



**Figura N°14: Isoplot: Placebo Clorfenamina Maleato 4 mg Tabletas**

Data File C:\CHEM32\...\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220 2014-02-20 18-10-32\1402000069.D  
Sample Name: PB CN

```
=====
Acq. Operator   : G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO      Seq. Line :   61
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD-3/HPLC09        Location  : Vial 63
Injection Date  : 21/02/2014 02:03:10 a.m.      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 40 µl
Sequence File   : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                                           2014-02-20 18-10-32\CLORF140220.S
Acq. Method     : C:\Chem32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                                           2014-02-20 18-10-32\CLORFENAMINAESP.M
Last changed    : 21/02/2014 02:03:00 a.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
                                           (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                                           2014-02-20 18-10-32\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 24/02/2014 09:39:04 a.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
Method Info     : DISOLUCION Y RESISTENCIA DE OMEPRAZOL CAPSULAS
=====
```



External Standard Report

```
=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Monday, 24 Feb 2014 09:39:04 a.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=265,4 Ref=off

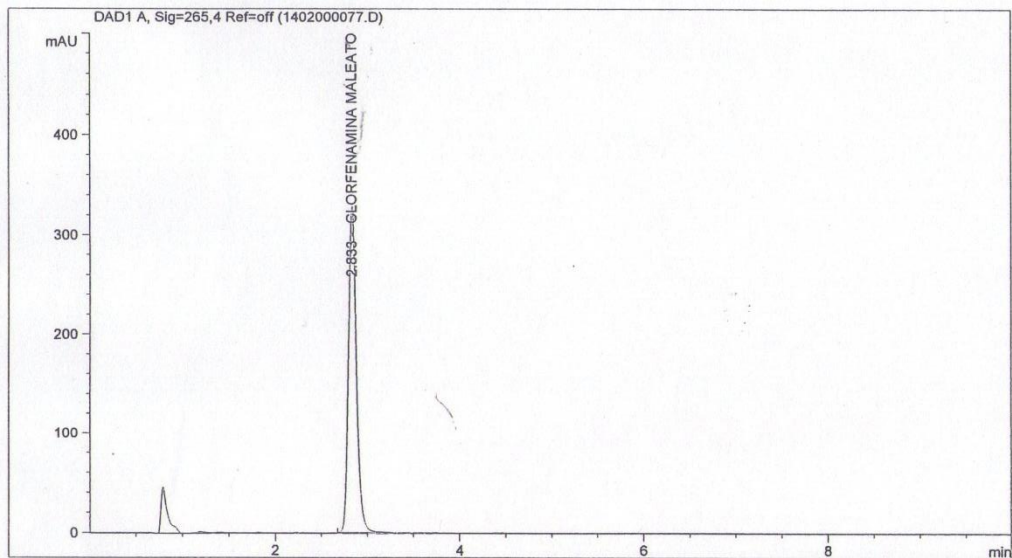
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount	Grp	Name
2.830	-	-	-	-	-	CLORFENAMINA MALEATO

Totals : 0.00000

**Figura N°15: Cromatograma del Placebo**

Data File C:\CHEM32\...\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220 2014-02-20 18-10-32\1402000077.D  
Sample Name: PC CN

```
=====
Acq. Operator   : G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO      Seq. Line :   69
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD-3/HPLC09        Location  : Vial 70
Injection Date  : 21/02/2014 03:27:27 a.m.      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 40 µl
Sequence File   : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                  2014-02-20 18-10-32\CLORF140220.S
Acq. Method     : C:\Chem32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                  2014-02-20 18-10-32\CLORFENAMINAESP.M
Last changed    : 21/02/2014 03:27:17 a.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                  2014-02-20 18-10-32\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 24/02/2014 09:39:04 a.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
Method Info     : DISOLUCION Y RESISTENCIA DE OMEPRAZOL CAPSULAS
=====
```



External Standard Report

```
=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Monday, 24 Feb 2014 09:39:04 a.m.
Multiplier     : 1.241e3
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=265,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount	Grp	Name
2.833	BB	1945.24548	4.06510e-5	98.10953		CLORFENAMINA MALEATO

Totals : 98.10953

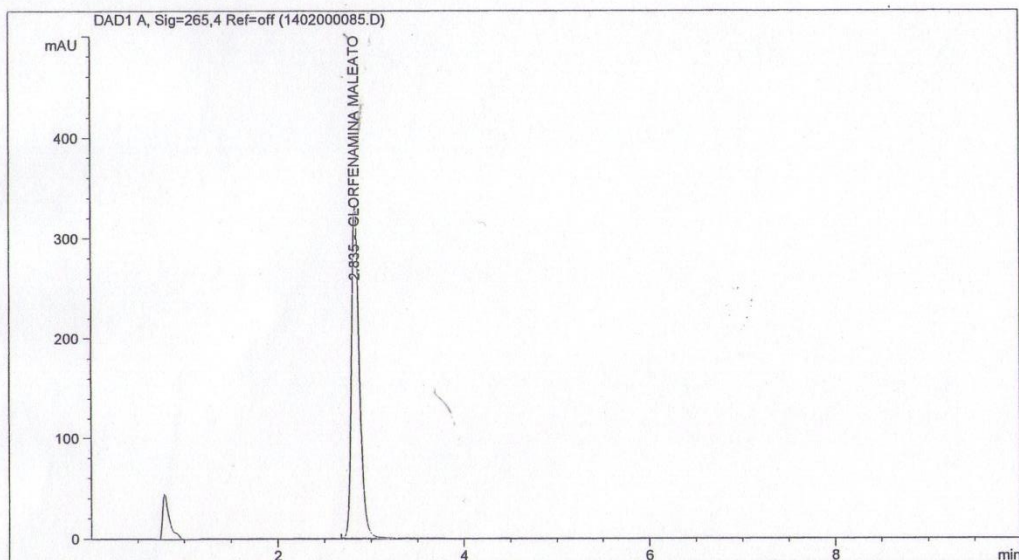
**Figura N°16: Cromatograma del Placebo Cargado**



Data File C:\CHEM32\...\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220 2014-02-20 18-10-32\1402000085.D  
Sample Name: ST CN

```
=====
Acq. Operator   : G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO      Seq. Line :   77
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD-3/HPLC09       Location  : Vial 51
Injection Date  : 21/02/2014 04:51:44 a.m.     Inj       :    1
                                           Inj Volume: 40 µl

Sequence File   : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                  2014-02-20 18-10-32\CLORF140220.S
Acq. Method     : C:\Chem32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                  2014-02-20 18-10-32\CLORFENAMINAESP.M
Last changed    : 21/02/2014 04:51:34 a.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                  2014-02-20 18-10-32\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 24/02/2014 09:39:04 a.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
Method Info     : DISOLUCION Y RESISTENCIA DE OMEPRAZOL CAPSULAS
=====
```



External Standard Report

```
=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Monday, 24 Feb 2014 09:39:04 a.m.
Multiplier     : 1.244e3
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=265,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount	Grp	Name
2.835	BB	1972.84973	4.06510e-5	99.79890		CLORFENAMINA MALEATO

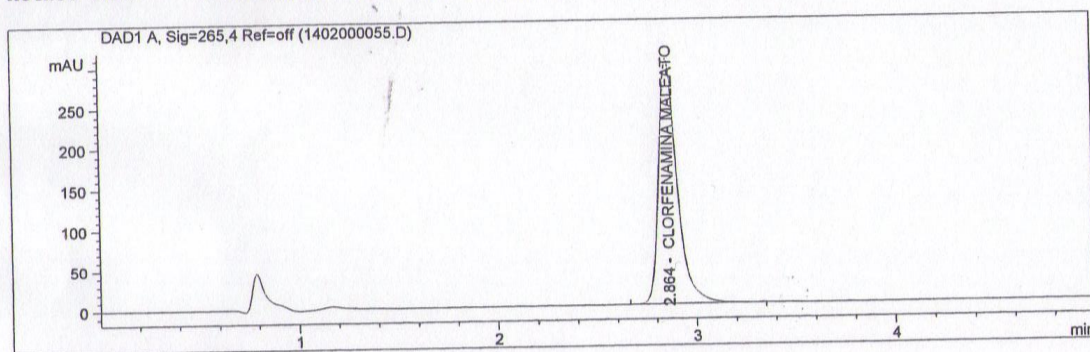
Totals : 99.79890

Figura N°17: Cromatograma del Estándar

Data File C:\CHEM32\...DACIONES\2014\DEXACORT\DEXA140221A 2014-02-21-31-31\1402000055.D  
Sample Name: EX-100%-1

```
=====
Acq. Operator   : M. PEÑA/C. CABALLERO           Seq. Line :   48
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD-3/HPLC09         Location  : Vial 22
Injection Date  : 22/02/2014 01:08:23 a.m.      Inj       :    1
                                                Inj Volume: 40 µl

Sequence File   : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\DEXACORT\DEXA140221A 2014-02-21 16-
                  31-31\DEXA140221A.S
Acq. Method     : C:\Chem32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\DEXACORT\DEXA140221A 2014-02-21 16-
                  31-31\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 22/02/2014 01:08:11 a.m. by M. PEÑA/C. CABALLERO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\DEXACORT\DEXA140221A 2014-02-21 16-
                  31-31\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 24/02/2014 03:16:28 p.m. by G. CHUMIOQUE/C. CABALLERO
Method Info     : VALIDACIÓN DEL METODO ANALÍTICO DE DEXACORT TABLETAS
=====
```



External Standard Report

```
=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Monday, 24 Feb 2014 03:16:28 p.m.
Multiplier     : 1.252e3
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=265,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
2.864	BB	1936.01990	4.09216e-5	99.20533		CLORFENAMINA MALEATO
Totals :				99.20533		

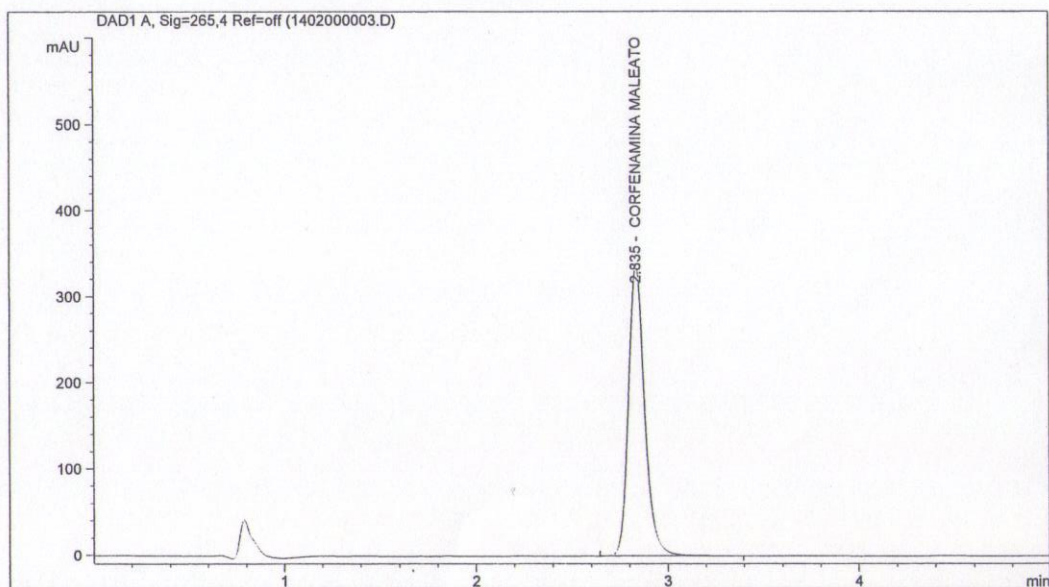
\*\*\* End of Report \*\*\*

Figura N°18: Cromatograma de la Exactitud



Data File C:\CHEM32\...CLORFENAMINA TABLETAS\CLOR140219 2014-02-19 15-24-52\1402000003.D  
Sample Name: LS-100%

```
=====
Acq. Operator   : L.PALACIOS/K.MAMANI           Seq. Line :    3
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD-3/HPLC09        Location  : Vial 3
Injection Date  : 19/02/2014 03:38:35 p.m.      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 40 µl
Sequence File   : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLOR140219
                                           2014-02-19 15-24-52\CLOR140219.S
Acq. Method     : C:\Chem32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLOR140219
                                           2014-02-19 15-24-52\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 19/02/2014 03:24:47 p.m. by L.PALACIOS/K.MAMANI
Analysis Method : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLOR140219
                                           2014-02-19 15-24-52\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 19/02/2014 05:02:53 p.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
                                           (recalibrated in sequence after loading)
Method Info     : CONTENIDO DE CLORFENAMINA MALEATO
=====
```



=====  
Calibration Table (after recalibration)  
=====

Calib. Data Modified : Wednesday, 19 February 2014 05:02:53 p.m.

Level 3 calibrated: Replace Response Factors,  
Replace Retention Times

Signal 1: DAD1 A, Sig=265,4 Ref=off

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [%]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
2.835	1	4.81000e-2	1189.90125	4.04235e-5	CORFENAMINA MALEATO
	2	6.41000e-2	1586.64673	4.03997e-5	
	3	8.01000e-2	1994.20325	4.01664e-5	
	4	9.61000e-2	2391.65479	4.01814e-5	
	5	1.12200e-1	2756.20801	4.07081e-5	

**Figura N°19: Cromatograma de la Linealidad de Sistema**

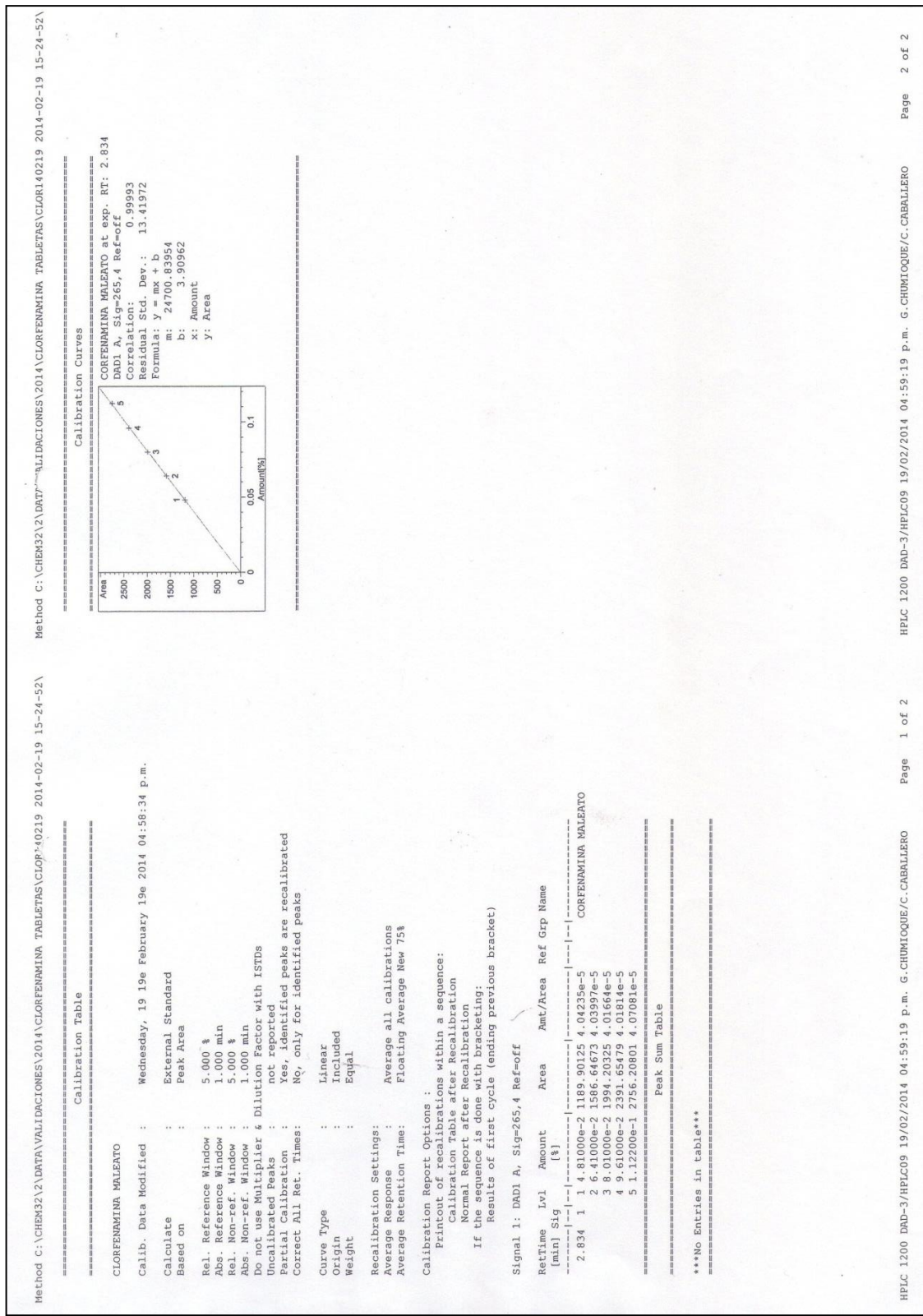
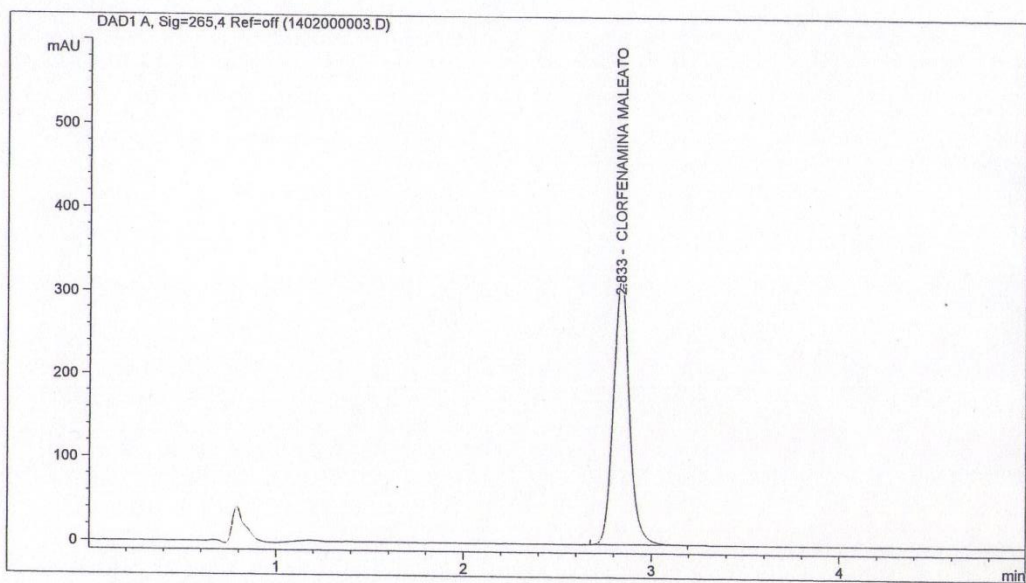


Figura N°20: Resultado de la Linealidad de Sistema

Data File C:\CHEM32\...LORFENAMINA TABLETAS\CLOR140219A 2014-02-19 16-06-43\1402000003.D  
Sample Name: LM-100%

```
=====
Acq. Operator   : G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO      Seq. Line :    3
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD-3/HPLC09        Location  : Vial 13
Injection Date  : 19/02/2014 04:19:59 p.m.      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 40 µl

Sequence File   : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLOR140219A
                  2014-02-19 16-06-43\CLOR140219A.S
Acq. Method     : C:\Chem32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLOR140219A
                  2014-02-19 16-06-43\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 19/02/2014 04:03:19 p.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
Analysis Method : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLOR140219A
                  2014-02-19 16-06-43\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 19/02/2014 04:41:44 p.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
                  (recalibrated in sequence after loading)
Method Info     : CONTENIDO DE CLORFENAMINA MALEATO
=====
```



=====  
Calibration Table (after recalibration)  
=====

Calib. Data Modified : Wednesday, 19 February 2014 04:41:44 p.m.

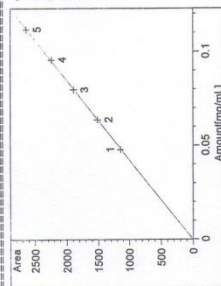
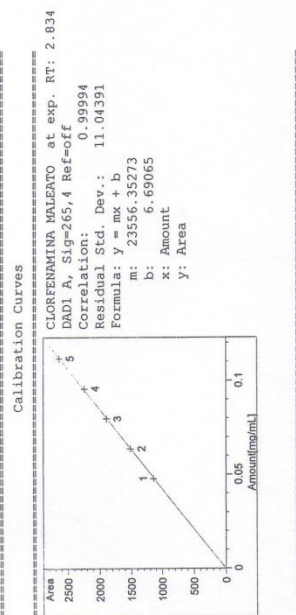
Level 3 calibrated: Replace Response Factors,  
Replace Retention Times

Signal 1: DAD1 A, Sig=265,4 Ref=off

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [mg/mL]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
2.833	1	4.78000e-2	1145.13733	4.17417e-5	CLORFENAMINA MALEATO
	2	6.38000e-2	1510.06580	4.22498e-5	
	3	7.97000e-2	1889.72498	4.21754e-5	
	4	9.56000e-2	2243.10425	4.26195e-5	
	5	1.11600e-1	2639.31812	4.22836e-5	

**Figura N°21: Cromatograma de la Linealidad del Método**





Calibration Table

CLORFENAMINA MALEATO

Calib. Data Modified : Wednesday, 19 19e February 19e 2014 04:41

Calculate	:	External Standard
Based on	:	Peak Area
Rel. Reference Window :	:	5.000 %
Rel. Reference Window :	:	1.000 min
Rel. Non-ref. Window :	:	5.000 %
Rel. Non-ref. Window :	:	1.000 min
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs	:	not reported
Uncalibrated Peaks :	:	Yes, identified peaks are recalibrated
Partial Calibration :	:	No, only for identified peaks
Correct All Ret. Times:	:	
Curve Type	:	Linear
Origin	:	Included
Weight	:	Equal
Recalibration Settings:	:	
Average Response :	:	Average all calibrations
Average Retention Time:	:	Floating Average New 75%
Calibration Report Options :	:	
Printout of recalibrations within a sequence:	:	
Calibration Table after Recalibration	:	
Normal Report after Recalibration	:	
If the sequence is done with bracketing:	:	
Results of first cycle (ending previous bracket)	:	
Signal 1: DADI A, Sig-265,4 Ref-off	:	

RetTime	Lvl	Amount	Area	Amnt/Area	Ref Grp Name
(min)	Sig	(mg/mL)			
2.834	1	1.478000e-2	1145.13733	4.17417e-5	CLORFENAMINA MALE
	2	6.38000e-2	1510.06580	4.22498e-5	
	3	7.97000e-2	1899.72498	4.21754e-5	
	4	9.56000e-2	2243.10425	4.26195e-5	
	5	1.11600e-1	2639.31812	4.22836e-5	

Peak Sum Table

\*\*\*No Entries in table\*\*\*

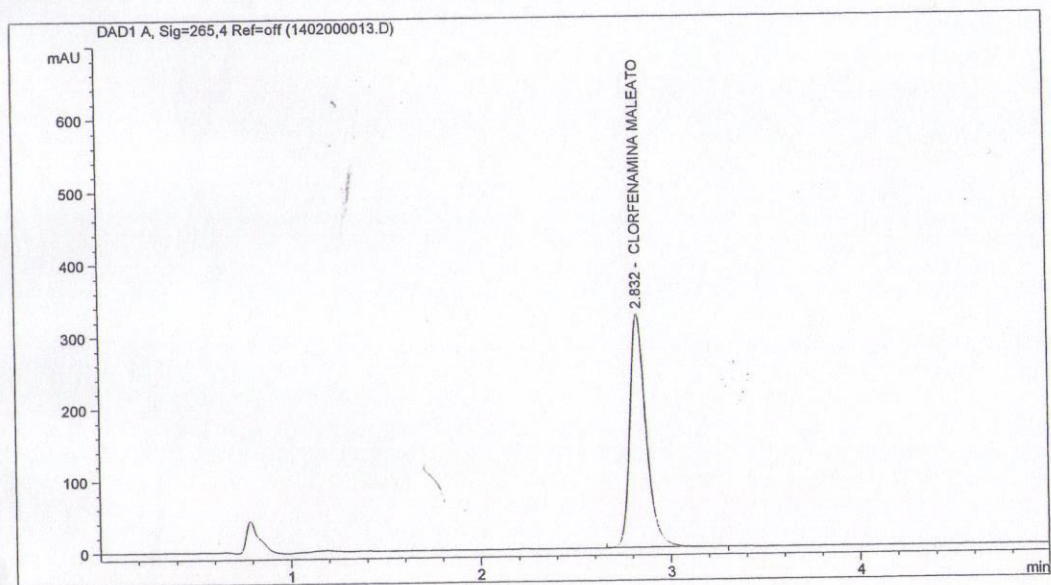
Data File C:\CHEM32\...\CLORFENAMINA TABLETAS\CLOR140219B 2014-02-19 16-52-07\1402000013.D  
Sample Name: REP-1

```

=====
Acq. Operator   : G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO      Seq. Line :   13
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD-3/HPLC09       Location  : Vial 23
Injection Date  : 19/02/2014 06:15:25 p.m.     Inj       :    1
                                           Inj Volume: 40 µl

Sequence File   : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLOR140219B
                                           2014-02-19 16-52-07\CLOR140219B.S
Acq. Method     : C:\Chem32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLOR140219B
                                           2014-02-19 16-52-07\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 19/02/2014 04:48:37 p.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
Analysis Method : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLOR140219B
                                           2014-02-19 16-52-07\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 20/02/2014 09:06:28 a.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
Method Info     : CONTENIDO DE CLORFENAMINA MALEATO
=====

```



#### External Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 20 February 2014 09:06:28 a.m.
Multiplier     : 1.253e3
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=265,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
2.832	BB	1929.45642	4.04264e-5	97.76752		CLORFENAMINA MALEATO

Totals : 97.76752

**Figura N°23: Cromatograma de la Repetibilidad**

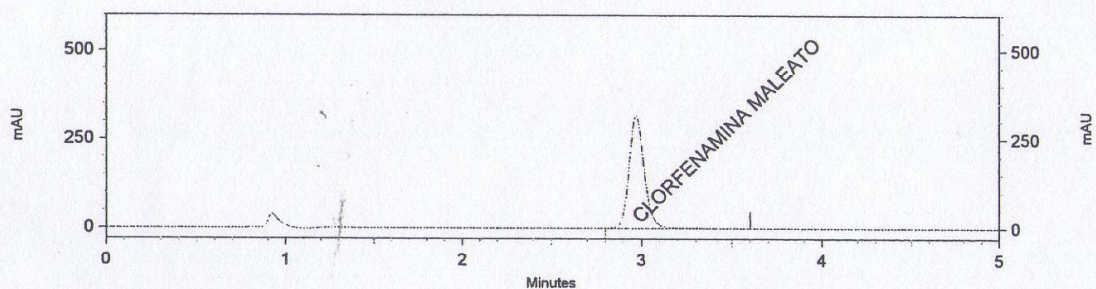


## REPORTE DE RESULTADOS HPLC - ELITE 1

### CONTROL DE CALIDAD

**MUESTRA :** M-1 **ANALISTA:** D.MENDOZA/C.CABALLERO  
**FECHA DE ANÁLISIS:** 03/03/2014 13:21:31 **FECHA DE IMPRESIÓN:** 03/03/2014 18:12:37  
**MÉTODO :** C:\EZChrom Elite\Projects\Default\VALIDACIONES\METHOD\CLORFENAMINA TABLETAS.met  
**SECUENCIA :** C:\EZChrom Elite\Projects\Default\VALIDACIONES\SECUENCIA\CLORFENAMINA TAB\PRECISIÒN INTERMEDIA-DOS.seq  
**DATA :** C:\EZChrom Elite\Projects\Default\VALIDACIONES\DATA\CLORFENAMINA TAB\PRECISIÒN INTERMEDIA-DOSAJE\M-1-Rep1.dat  
**VIAL :** 173 **VOLUMEN DE INYECCIÒN:** 40 uL

CLORFENAMINA MALEATO Long. onda : 265 nm



#### UV Results

Retention Time	Name	Area	ESTD concentration	Units	Theoretical plates (USP)
2.97	CLORFENAMINA MALEATO	7391417	95.3072	g	6200

PESO MUESTRA : 1 FACTOR DE MULTIPLICACION-1: 12.5212  
 FACTOR DE MULTIPLICACION-2: 1 FACTOR DE MULTIPLICACION-3: 1  
 FACTOR DE DILUCION-1: 1

-----  
 < General Method Parameters >  
 -----

No items selected for this section

-----  
 < UV >  
 -----

No items selected for this section

#### Performance Parameters

=====  
 Calculate Performance Parameters: Yes  
 Unretained Peak Time: 0 (Minutes)  
 Column Length (Meters): 0.125 (Meters)  
 Particle Diameter: 5.000 (Microns)  
 Column Serial Number: 318720 lote HX350896  
 Column Installation Date: 2013-11-29  
 Column Description: Purospher star RP-18e Merck  
 COD: 13-046

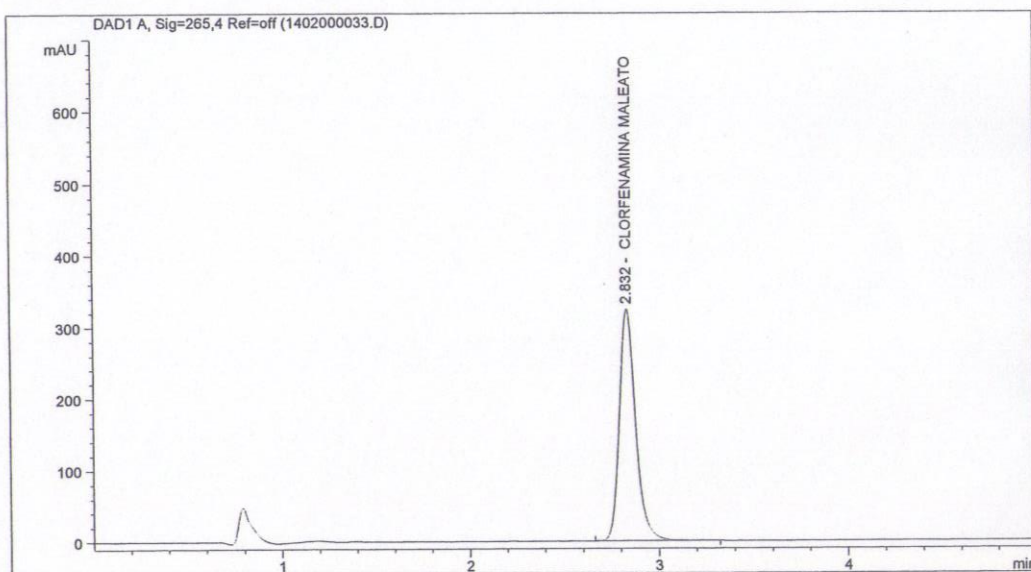
USP Calculation Method: Enabled

Electronic Signature				
User	Time	Reason	Role	Comment
CCABALLERO	03/03/2014 18:09:14	Analizado por	Analista II	FE

**Figura N°24: Cromatograma de la Precisión Intermedia**

Data File C:\CHEM32\... \CLORFENAMINA TABLETAS\CLOR140219B 2014-02-19 16-52-07\1402000033.D  
Sample Name: ROB-1

```
=====
Acq. Operator   : G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO      Seq. Line :   27
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD-3/HPLC09        Location  : Vial 33
Injection Date  : 19/02/2014 08:11:17 p.m.      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 40 µl
Sequence File   : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLOR140219B
                                           2014-02-19 16-52-07\CLOR140219B.S
Acq. Method     : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLOR140219B
                                           2014-02-19 16-52-07\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 19/02/2014 04:48:37 p.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
Analysis Method : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLOR140219B
                                           2014-02-19 16-52-07\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 20/02/2014 09:18:16 a.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
Method Info     : CONTENIDO DE CLORFENAMINA MALEATO
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 20 20e February 20e 2014 09:18:16 a.m.
Multiplier     : 1.253e3
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=265,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
2.832	BB	1934.59729	4.03942e-5	97.94990		CLORFENAMINA MALEATO
Totals :				97.94990		

Figura N°25: Cromatograma de la Robustez

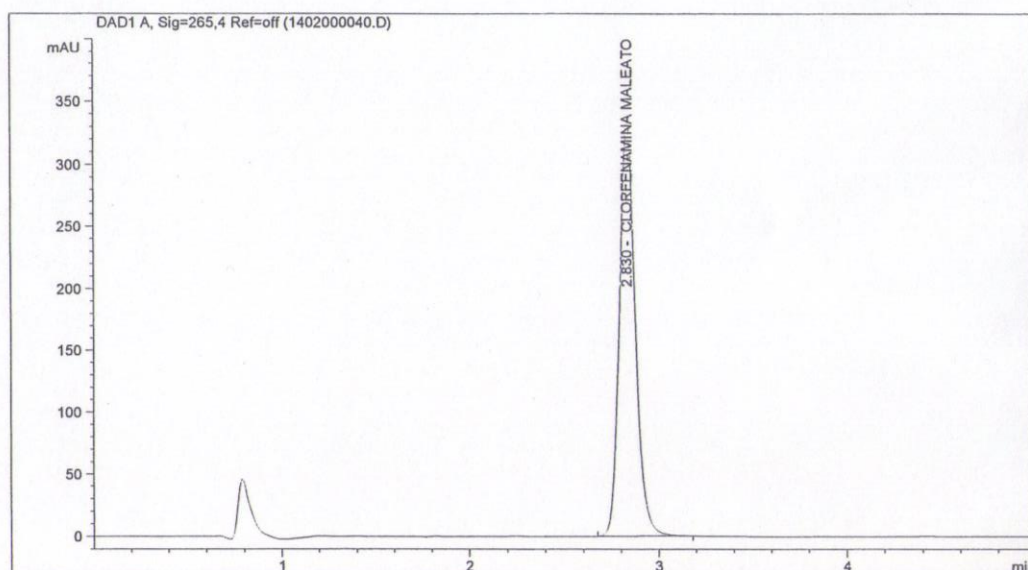


Data File C:\CHEM32\...ORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220 2014-02-20 18-10-32\1402000040.D  
Sample Name: ST-EST

```

=====
Acq. Operator   : G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO      Seq. Line :   38
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD-3/HPLC09       Location  : Vial 21
Injection Date  : 20/02/2014 11:15:06 p.m.     Inj       :    1
                                           Inj Volume: 40 µl
Sequence File   : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                  2014-02-20 18-10-32\CLORF140220.S
Acq. Method     : C:\Chem32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                  2014-02-20 18-10-32\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 20/02/2014 11:14:54 p.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                  2014-02-20 18-10-32\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 21/02/2014 11:45:45 a.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
Method Info     : VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE CLORFENAMINA MALEATO 4 mg TABLETAS
=====

```



#### External Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Friday, 21 Feb 2014 11:45:45 a.m.
Multiplier     : 1.246e3
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=265,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
2.830	BB	1961.31897	4.07200e-5	99.53253		CLORFENAMINA MALEATO

Totals : 99.53253

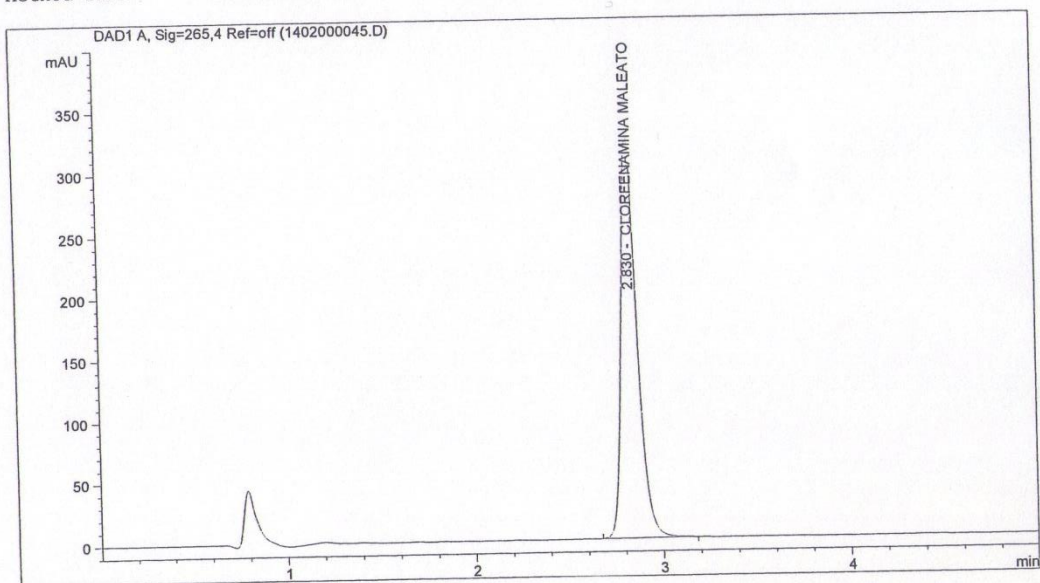
**Figura N°26: Cromatograma de la Estabilidad de Sistema**



Data File C:\CHEM32\... \ORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220 2014-02-20 18-10-32\1402000045.D  
Sample Name: M-1-EST

```
=====
Acq. Operator   : G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO      Seq. Line :   43
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD-3/HPLC09        Location  : Vial 23
Injection Date  : 20/02/2014 11:44:04 p.m.      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 40 µl

Sequence File   : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                  2014-02-20 18-10-32\CLORF140220.S
Acq. Method     : C:\Chem32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                  2014-02-20 18-10-32\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 20/02/2014 11:43:52 p.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACIONES\2014\CLORFENAMINA TABLETAS\CLORF140220
                  2014-02-20 18-10-32\CLORFENAMINA.M
Last changed    : 21/02/2014 11:45:45 a.m. by G.CHUMIOQUE/C.CABALLERO
Method Info     : VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE CLORFENAMINA MALEATO 4 mg TABLETAS
=====
```



External Standard Report

```
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Friday, 21 Feb 2014 11:45:45 a.m.
Multiplier     : 1.253e3
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=265,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
2.830	BB	1913.00928	4.07200e-5	97.63820		CLORFENAMINA MALEATO
Totals :				97.63820		

**Figura N°27: Cromatograma de la Estabilidad de la Muestra**